

# **Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNF-R1)- Internalisierung**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

– Biologie und vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Oliver Merkel**

aus Marktoberdorf

Februar

2007

Promotionsgesuch eingereicht am: 14.02.2007

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. Wulf Schneider

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Bernd Kramer

1.Gutachter/Prüfer: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

2.Gutachter/Prüfer: PD Dr. Wulf Schneider

3.Prüfer: Prof. Dr. Richard Warth

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2003 bis Februar 2007 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg unter der Betreuung von PD Dr. Wulf Schneider.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1	Apoptose .....	8
1.1.1	Das Phänomen der Apoptose und seine Bedeutung in der Physiologie .....	8
1.1.2	Die molekularen Mechanismen der Apoptose .....	10
1.1.2.1	Der intrinsische Apoptoseweg .....	11
1.1.2.2	Der extrinsische Apoptoseweg .....	13
1.2	TNF .....	14
1.3	TNF-Rezeptoren .....	16
1.3.1	Die Signaltransduktion des TNF-R1 .....	17
1.4	Die clathrinvermittelte Endozytose .....	20
1.5	E3-14.7K - ein Inhibitor der TNF-induzierten Apoptose .....	25
1.5.1	Biologie der Adenoviren .....	25
1.5.2	E3-14.7K .....	30
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.1	Material .....	33
3.1.1	Geräte .....	33
3.1.2	Chemikalien, Reagenzien, Lösungen und Medien .....	33
3.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	34
3.1.4	Enzyme .....	34
3.1.5	Antikörper .....	34
3.1.6	Kits .....	35
3.1.7	Primer .....	35
3.1.8	Zelllinien und Bakterienstämme .....	35

3.2	Methoden .....	36
3.2.1	Arbeiten mit DNA.....	36
3.2.1.1	Agarosegelelektrophorese.....	36
3.2.1.2	PCR-Mutagenese .....	36
3.2.1.3	Verdau von Vektor-DNA .....	37
3.2.1.4	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren .....	38
3.2.1.5	Transformation .....	38
3.2.1.6	Präparation von DNA.....	38
3.2.1.7	Verifizierung von DNA .....	38
3.2.1.8	Klonierungen .....	39
3.2.2	Zellkultur .....	40
3.2.3	Retroviraler Gentransfer .....	41
3.2.3.1	Herstellung der Retroviren.....	41
3.2.3.2	Infektion mit Retroviren.....	41
3.2.3.3	Selektion der retroviral infizierten Zellen.....	42
3.2.4	Herstellung der Ad5-Mutanten.....	42
3.2.4.1	Ad5 WT und Ad5 19K <sup>-</sup> /PM-14.7K .....	42
3.2.4.2	Ad5 19K <sup>-</sup> /E3 <sup>-</sup> .....	43
3.2.5	Bestimmung des Virentiters.....	43
3.2.6	Bestimmung der Infektionseffizienz .....	44
3.2.7	Bestimmung der Oberflächenexpression der TNF-R1-Konstrukte.....	44
3.2.8	Biotin-TNF/Avidin-FITC-Internalisierung .....	44
3.2.8.1	Biotin-TNF/Avidin-FITC-Internalisierung in Abhängigkeit des TNF-R1-Konstrukts .....	44
3.2.8.2	Biotin-TNF/Avidin-FITC-Internalisierung in Abhängigkeit der Ad5-Mutante .....	45
3.2.9	Isolierung magnetisch markierter Zellfraktionen .....	45
3.2.10	Zytotoxizitätstest.....	46
3.2.11	Nachweis der E3-14.7K-Expression .....	47
3.2.12	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	48
3.2.13	Proteinnachweis .....	48
3.2.14	Bestimmung der N-SMase-Aktivität.....	49

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
4.1	Die Funktion der TNF-R1-Internalisierung .....	50
4.1.1	Vorarbeiten .....	50
4.1.2	Expression verschiedener TNF-R1-Konstrukte .....	51
4.1.3	Die Bedeutung des Aminosäuremotivs YQRW für die Internalisierung des TNF-R1 .....	54
4.1.4	Einfluss der TNF-R1-Internalisierung auf die DISC-Rekrutierung .....	56
4.1.5	Einfluss der TNF-R1-Internalisierung auf die TNF-induzierte Apoptose .....	60
4.1.5.1	Bestimmung der TNF-Zytotoxizität in TNF-R1-internalisierungs- defizienten Zellen .....	60
4.1.6	Untersuchungen an TNF-R1 $\Delta$ TRID $\Delta$ NSD-Zellen .....	63
4.1.7	Aktivität der N-SMase nach TNF-Stimulation .....	68
4.2	Untersuchungen zur E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz .....	71
4.2.1	Vorarbeiten .....	71
4.2.2	Mechanismus der E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz in humanen E3-14.7K-Zellen .....	72
4.2.2.1	Herstellung humaner E3-14.7K-Zellen .....	72
4.2.2.2	TNF-R1-Internalisierung in humanen E3-14.7K-Zellen .....	73
4.2.2.3	DISC-Rekrutierung in humanen E3-14.7K-Zellen .....	74
4.2.2.4	TNF-Resistenz humaner E3-14.7K-Zellen .....	76
4.2.3	Mechanismus der E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz in infizierten humanen Zellen .....	78
4.2.3.1	Wahl der Infektionsbedingungen .....	79
4.2.3.2	TNF-R1-Internalisierung in Ad5-infizierten Zellen .....	81
4.2.3.3	DISC-Rekrutierung in Ad5-infizierten H1299-Zellen .....	83
4.2.3.4	E3-14.7K-vermittelte TNF-Resistenz in Ad5-infizierten H1299-Zellen ..	85
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
5.1	Abhängigkeit der TNF-induzierten Apoptose von der Internalisierung des TNF-R1 .....	88

5.1.1	TNF-R1/TNF-R2-defiziente Mausfibroblasten mit rekonstituierten TNF-R1-Konstrukten als Zellsystem.....	89
5.1.2	Die Aminosäuresequenz YQRW innerhalb der TRID vermittelt die Internalisierung des TNF-R1. ....	89
5.1.3	Apoptoseinduktion durch TNF ist nur bei einer Internalisierung des TNF-R1 möglich .....	94
5.2	Verhinderung der TNF-induzierten Apoptose durch E3-14.7K .....	102
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>Eigene Publikationen .....</b>	<b>135</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>136</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>138</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>142</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>143</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Apoptose

### 1.1.1 Das Phänomen der Apoptose und seine Bedeutung in der Physiologie

Bereits im neunzehnten Jahrhundert erschienen mehr als einhundert Veröffentlichungen von Histologen und Embryologen, die in der einen oder anderen Form die Existenz eines „natürlichen“ Zelltodes beschrieben (Clarke und Clarke, 1996). Es dauerte aber fast weitere einhundert Jahre, bis die Wissenschaft erkannte, dass der gezielte Tod von Zellen in Organismen nicht nur einfach eine Zelle gegen eine andere ersetzt, sondern dass diesem Prozess zentrale Funktionen sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten Organismus zukommen. Der Begriff Apoptose wurde 1971 gemeinsam von John Kerr, Andrew Wyllie und A.R. Currie eingeführt (Kerr *et al.*, 1972). Er leitet sich aus der griechischen Bezeichnung für das herbstliche Abfallen der Blätter und den Verlust des Haupthaars in der menschlichen Seneszenz ab. Kerr hatte ursprünglich eine Form des Zelltodes beschrieben, die er *shrinkage necrosis* nannte (Kerr, 1971), bei der sterbende Zellen nicht platzten, wie es oft sonst beobachtet wurde, sondern im Gegenteil schrumpften. Das Besondere am Schrumpfen einer Zelle ist, dass dies aktiv, unter Einsatz von Energie geschieht. Neben dem Schrumpfen der Zelle definierten Kerr, Wyllie und Currie Apoptose noch anhand weiterer morphologischer Kriterien. Zu ihnen zählen die Fragmentierung des Nukleus, die Ausstülpung der Zellmembran (*membrane blebbing*) und das Vesikulieren der Zelle zu apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*). Inzwischen ist Apoptose auch biochemisch anhand des Abbaus der Zellkern-DNA zu Fragmenten definierter Länge (*DNA Laddering*) (Cohen *et al.*, 1994), der Exposition von Phosphatidylserin an der Zellmembranaußenseite (Martin *et al.*, 1995c) und der proteolytischen Spaltung zahlreicher



intrazellulärer Substrate charakterisiert (Martin *et al.*, 1995a). Der Begriff Apoptose wird zwar oft als Synonym für programmierten Zelltod gebraucht, man sollte sich aber bewusst sein, dass die Definition von Apoptose nicht allen bekannten Phänotypen von regulierten Zelltoden entspricht und dass es mehrere Formen des programmierten Zelltodes (Schwartz *et al.*, 1993; Wyllie und Golstein, 2001), wie z.B. die Autophagozytose, gibt. Autophagozytose ist durch den Abbau von zellulären Bestandteilen in autophagozytotischen Vesikeln und die Kondensation von Chromatin gekennzeichnet. Eine Fragmentierung der Kern-DNA tritt hier ebenfalls auf, aber zu einem sehr späten Zeitpunkt (Bursch, 2001). Andere alternative Zelltode, die ebenfalls nach einem genetisch vorgegebenen Programm ablaufen, sind Paraptose, Nekroptose und Onkose (Fadeel und Orrenius, 2005).

Der Apoptose wird die Nekrose gegenübergestellt. Bei der Nekrose handelt es sich um eine Form des Zelltods, die nicht von der Zelle selbst induziert wird und deshalb auch nicht aktiv unter Energieaufwand abläuft, sondern bei dem die Zelle ihre strukturelle Integrität passiv aufgrund z.B. mechanischer Zerstörung oder Temperaturänderungen verliert, platzt und ihren Inhalt in das umgebende Gewebe entlässt (Farber, 1994). Die dabei freigesetzten Substanzen führen meist zu Entzündungsreaktionen. Im Gegensatz dazu werden apoptotische Körperchen von Nachbarzellen oder spezialisierten Phagozyten aufgenommen, so dass Apoptose zu keiner proinflammatorischen Immunantwort führt. Allerdings ist es oft schwierig, Apoptose von Nekrose zu trennen, da dasselbe Gewebe und sogar dieselbe Zelle Merkmale beider Zelltodformen aufweisen kann (Kerr *et al.*, 1972; Kajstura *et al.*, 1996).

Lange bekannt und gut untersucht ist Apoptose in der Ontogenese tierischer Organismen. Hier findet man sie bei Vertretern aller untersuchten Tierstämme, vom Nematoden *Caenorhabditis elegans* bis zum *Homo sapiens* (Buss *et al.*, 2006). Das gezielte Absterben von Zellen stellt einen wichtigen Prozess bei der Entwicklung von Geweben dar. Während der menschlichen Gehirnentwicklung stirbt ein Großteil der Neuronen, die sich mit anderen Neuronen nicht oder falsch verschaltet haben, nach Entzug von Wachstumsfaktoren apoptotisch ab (Naruse und Keino, 1995). Andere Strukturen, wie der Wolfsche Gang, die ab

einem bestimmten Zeitpunkt in der Embryogenese nicht mehr benötigt werden, verschwinden ebenfalls durch Apoptose der entsprechenden Zellen (Buss *et al.*, 2006). Auch tritt Apoptose in großem Umfang bei der Metamorphose von Insekten und Amphibien auf (Ishizuya-Oka und Shimozawa, 1992).

Apoptose spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Gewebekomöostase in adulten Organismen. So treten Zellen in Apoptose, wenn ihre DNA aufgrund äußerer Einflüsse, wie ionisierender Strahlung, geschädigt wurde (Lowe *et al.*, 1993). Durch ihre Selbstzerstörung schützen sie den Körper, da mutagenisierte Zellen Tumore bilden können und damit eine Gefahr für den Organismus darstellen. Immunologisch spielt Apoptose ebenfalls eine wichtige Rolle. Beim negativen Selektionsprozess von T- und B-Zellen werden diejenigen Zellen, die körpereigene Epitope erkennen, durch Apoptose eliminiert, um den Organismus vor Autoimmunität zu bewahren (Jacobson *et al.*, 1997). Zellen, die vom Immunsystem als krankhaft erkannt wurden, z.B. Tumorzellen und viren-infizierte Zellen, werden ebenfalls entfernt, indem ihr apoptotisches Programm aktiviert wird (Krammer, 2000). Bedingt durch die zahlreichen physiologischen Prozesse, in die Apoptose involviert ist, gibt es viele Krankheitsbilder, die durch ein fehlerhaftes Auftreten oder Ausbleiben von Apoptose verursacht werden. Neurodegenerative Krankheiten, wie Alzheimer (Smale *et al.*, 1995; de la Monte *et al.*, 1998) oder Parkinson (Anglade *et al.*, 1997; Tatton *et al.*, 1998), werden durch Apoptose im Zentralen Nervensystem verursacht. Umgekehrt können sich Tumoren im Körper entwickeln, wenn die betreffenden entarteten Zellen nicht mehr auf apoptotische Stimuli reagieren (Fulda und Debatin, 2004; Gerl und Vaux, 2005).

### **1.1.2 Die molekularen Mechanismen der Apoptose**

Die molekularen Abläufe, die vom ersten apoptotischen Stimulus bis zum Einsetzen der Apoptose führen, lassen sich in einen extrinsischen und einen intrinsischen gliedern (Fadeel und Orrenius, 2005). Man spricht vom extrinsischen Weg der Apoptose, wenn Apoptose durch die Aktivierung einer Gruppe von Zellmembranrezeptoren, die als Todesrezeptoren bezeichnet werden, ausgelöst wird. Alternativ kann in einer Zelle intrinsisch Apoptose induziert werden, wenn

die Zelle „Stress“ ausgesetzt wird. Darunter versteht man all die Stimuli, welche die Zelle und v.a. ihre DNA schädigen, u.a. ionisierende Strahlung, Hypoxie und Nährstoffentzug (Helton und Chen, 2006). Eine Schädigung der DNA führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. Dies hat das Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase zur Folge, um eine Reparatur der beschädigten DNA zu ermöglichen. Kann die DNA nicht repariert werden, induziert p53 Apoptose (Hussain und Harris, 2006). Zudem ist p53 in der Lage, die Transkription des Todesrezeptors Fas zu erhöhen, womit die Zelle zusätzlich für die extrinsische Apoptose suszeptibel wird (Owen-Schaub *et al.*, 1995). Die molekularen Mechanismen des extrinsischen und intrinsischen Apoptosewegs unterscheiden sich in vielen Punkten, besitzen aber auch Gemeinsamkeiten.

#### **1.1.2.1 Der intrinsische Apoptoseweg**

Für den intrinsischen Apoptoseweg sind die Mitochondrien der Zelle entscheidend, indem sie apoptotische Faktoren, wie Cytochrom c und den Apoptose induzierenden Faktor (AIF), in das Zytoplasma entlassen. Die Permeabilität der mitochondrialen Membranen für diese Stoffe wird unter anderem durch die Bcl-2-Proteinfamilie bestimmt. Bcl-2 wurde ursprünglich als ein Onkogen in folliculären B-Zell-Lymphomen entdeckt (Pegoraro *et al.*, 1984) und ist ein Säugerhomolog des Apoptoserepressors ced-9 des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Vaux *et al.*, 1992). Inzwischen kennt man über 20 Mitglieder der Bcl-2-Familie, die entweder pro- oder antiapoptotische Reaktionen in der Zelle bedingen können. Sie zeichnen sich alle durch den Besitz mindestens einer von vier konservierten Domänen, den Bcl-2-homologen Domänen (BH1 bis BH4), aus (Cory und Adams, 2002). Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>, befinden sich stets an der Außenmembran der Mitochondrien und verhindern eine Freisetzung der proapoptotischen Faktoren aus dem Lumen der Mitochondrien (Susin *et al.*, 1996). Nach einem apoptotischen Stimulus wandern die proapoptotischen Bcl-2-Homologe, wie Bax, Bid und Bad, aus dem Zytoplasma oder anderen Organellen zum Mitochondrium, wo sie die Permeabilität für proapoptotische Faktoren stark

erhöhen, so dass diese ins Zytoplasma gelangen (Zimmermann *et al.*, 2001). Die verschiedenen Mitglieder der Bcl-2-Familie können Homo- und Heterodimere bilden, so dass letztlich das Verhältnis aus pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Homologen über eine Freisetzung der apoptotischen Faktoren ins Zytoplasma entscheidet (Chen *et al.*, 2005). Obwohl die Mechanismen dieser Freisetzung noch nicht im Detail aufgeklärt sind, scheint es so, dass hierfür spezielle Poren (PTP) verantwortlich sind, die sich an der Grenzfläche zwischen dem Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) der inneren Mitochondrienmembran und spannungsabhängigen Ionenkanälen (VDAC), aufgebaut aus sogenannten Porinen, in der Außenmembran bilden (Baines *et al.*, 2005). Die Porenbildung ist dabei von vielen endogenen Faktoren, wie Kalzium- und Magnesiumionen, Protonen, ATP, Membranpotentialen und eben auch vom Verhältnis der verschiedenen Bcl-2-Homologen abhängig (Szewczyk und Wojtczak, 2002).

Gelangt Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma, bewirkt es eine Multimerisierung der Protease Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*). Anschließend kommt es zur Bildung des Apoptosoms, eines Proteinkomplexes aus Apaf-1, Cytochrom c und Procaspase-9 (Zou *et al.*, 1999). Procaspase-9 wird dabei proteolytisch durch Apaf-1 in aktive Caspase-9 überführt. Die Prozessierung der Procaspase-9 ist allerdings nicht ohne weiteres möglich, da bestimmte Proteine, die IAPs (*inhibitors of apoptosis*), diese verhindern (Salvesen und Duckett, 2002). Damit wird sichergestellt, dass die Zelle ohne entsprechenden Stimulus nicht in Apoptose treten kann. Zusammen mit Cytochrom c wird aus dem Mitochondrium ein weiterer Faktor entlassen, Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*), auch DIABLO (*direct IAP-binding protein with low PI*) genannt. Dieser gewährleistet die Prozessierung der Procaspase-9 durch Apaf-1, indem er die Aktivität der IAPs blockiert (Du *et al.*, 2000). Caspase-9 aktiviert ihrerseits Caspase-3 und Caspase-7, die zahlreiche proapoptotische Proteine als Substrate erkennen. Die Aktivierung dieser Proteine führt zu den typischen morphologischen Merkmalen der Apoptose. So wird die Fragmentierung der DNA durch die Caspase-3-abhängige Aktivierung eines Komplexes aus CAD (*caspase-activated DNase*) und ihres Inhibitors iCAD (*inhibitor of CAD*) initiiert, indem Caspase-3 iCAD

spaltet. CAD transloziert daraufhin aus dem Zytoplasma in den Nukleus, wo sie mit dem Abbau des Chromatins beginnt (Enari *et al.*, 1998). Weiterhin kommt es durch die Spaltung von Gelsolin, PAK2 (p21-aktivierter Kinase-2) und Fodrin zu Ausstülpungen der Zellmembran (Kothakota *et al.*, 1997; Rudel und Bokoch, 1997; Martin *et al.*, 1995b). Die Exposition von Phosphatidylserin an der Zellmembranaußenseite verläuft ebenfalls caspaseabhängig (Vanags *et al.*, 1996).

Neben Cytochrom *c* gelangen noch weitere apoptotische Faktoren aus den Mitochondrien in das Zytoplasma, die an Struktur und Funktion des Apoptosoms aber nicht beteiligt sind. Zu den wichtigsten zählen AIF und Endonuclease G, die beide jeweils in den Nukleus wandern und dort caspaseunabhängig für einen Abbau der DNA sorgen (Cande *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2001).

### 1.1.2.2 Der extrinsische Apoptoseweg

Beim extrinsischen Apoptoseweg kommt es zunächst zu einer Aktivierung zellmembranständiger Rezeptoren. Die sieben bekannten Mitglieder dieser als Todesrezeptoren bezeichneten Gruppe (Fas/CD95, TNF-R1, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, TRAMP/DR3, DR6, EDAR) gehören allesamt zur TNF-Rezeptor-Superfamilie (Aggarwal, 2003). Todesrezeptoren besitzen eine intrazelluläre, je nach Rezeptor 65-80 Aminosäuren umfassende Todesdomäne (DD), über die der Zelltod vermittelt wird (Idriss und Naismith, 2000). Nach Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Rekrutierung verschiedener Proteine an die DD (Wajant *et al.*, 2003). Die nachfolgenden Prozesse, die zur Apoptose führen, sind zwischen den einzelnen Todesrezeptoren sehr ähnlich und werden im Folgenden anhand des bis jetzt am besten untersuchten Todesrezeptors Fas erläutert.

An die Todesdomäne wird zunächst FADD (*Fas associated death domain protein*) gebunden (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Boldin *et al.*, 1996). Die Bindung von FADD an die DD kommt dabei durch eine homophile Interaktion zwischen der Todesdomäne und der *death effector domain* (DED) von FADD zustande. FADD besitzt selbst eine Todesdomäne, an welche die Protease Caspase-8 mit

ihrer DED binden kann (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Der entstandene Komplex aus FADD und Caspase-8 trägt den Namen *death inducing signaling complex* (DISC) (Kischkel *et al.*, 1995). Bei der Rekrutierung des DISC wird durch proteolytische Spaltung die Proform der Caspase-8 in die aktive Form überführt (Muzio *et al.*, 1998). Prozessierte Caspase-8 dissoziiert von FADD und aktiviert Caspase-3. Die Aktivierung von Caspase-3 ist somit dem extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg gemeinsam (vgl. 1.1.2.1). Es gibt auch die Möglichkeit, dass der extrinsische Apoptoseweg in den intrinsischen übergeht, da Caspase-8 auch Bid als Substrat erkennt. Bid ist, wie oben erläutert, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie. Gespaltenes und damit aktives Bid, tBid (*truncated Bid*), transloziert zum Mitochondrium und setzt dort auf dem intrinsischen Weg Apoptose in Gang (Luo *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998b).

## 1.2 TNF

Zytokine sind Proteine, die als Botenstoffe von Zellen sekretiert werden und in vielfältiger Weise auf andere Zellen wirken. Sie können Zelldifferenzierung, Proliferation, die Sekretion weiterer Zytokine oder Apoptose auslösen. Zu den Zytokinen zählt man u.a. Interleukine, Lymphokine und Interferone (Burke *et al.*, 1993). In der Immunologie spielt das pleiotrope Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) eine wichtige Rolle. Es wird von Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, NK-Zellen und Neutrophilen produziert (Baud und Karin, 2001). TNF ist ein 157 Aminosäuren langes, 26kDa großes Protein, das zellmembranständig als Homotrimer exprimiert wird (Tang *et al.*, 1996). Durch den Verdau der Metalloprotease TACE (*TNF alpha converting enzyme*) kann TNF als 51kDa großes Trimer von der Zelloberfläche abgespalten werden (Gearing *et al.*, 1994; Black *et al.*, 1997). Sowohl das membrangebundene als auch das lösliche TNF ist biologisch aktiv. Während humanes TNF nach der Synthese unmodifiziert bleibt, liegt das zu 80% homologe murine TNF glykolisiert vor (Pennica *et al.*, 1985).

Auf die Wirkung von TNF wurde man zum ersten Mal im 19ten Jahrhundert aufmerksam. Zunächst erkannte der deutsche Mediziner P. Bruns, dass sich bei der Behandlung von Tumorkrankheiten eine Infektion der Patienten mit Bakterien positiv auswirkt (Bruns, 1868). Der amerikanische Arzt W.B. Coley führte dann von 1881 bis zu seinem Tod 1936 umfangreiche Tests zur Wirksamkeit von Extrakten aus Bakterienkulturen zur Tumorthherapie durch (Nauts H.C. *et al.*, 1953). Nach ihm ist ein Agens, das „Coley's Toxin“ benannt, welches er aus Kulturen von *Streptococcus pyrogenes* und *Serratia marcescens* gewann, und mit dem er teilweise Erfolge in der Bekämpfung von Tumoren erringen konnte, für die es zu seiner Zeit keine alternativen Behandlungsmöglichkeiten gab (Coley, 1891). Nach weitergehender Forschung an Tiermodellen stellte man fest, dass für die Tumorregression besonders die Verabreichung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien wirksam war (Westphal, 1975). Schließlich erkannten Carswell und seine Mitarbeiter, dass die tumorregressive Substanz nicht bakteriellen Ursprungs war, sondern vom Organismus selbst aufgrund der Infektion gebildet wurde und gaben ihr den Namen TNF (Carswell *et al.*, 1975). Zehn Jahre später erfolgte sowohl die Isolierung von TNF aus Überständen einer promyeloiden leukämischen Zelllinie (Aggarwal *et al.*, 1985) als auch das Klonieren der TNF-cDNA und die rekombinante Produktion von TNF in *E. coli* (Pennica *et al.*, 1985). TNF wird oft auch als TNF- $\alpha$  bezeichnet, um es vom strukturell und funktionell eng verwandten Zytokin Lymphotoxin- $\alpha$  bzw. TNF- $\beta$  zu unterscheiden (Porter, 1990).

Die Funktionsvielfalt von TNF geht weit über die Tumornekrose hinaus. Je nach Zelltyp und den momentanen physiologischen Bedingungen kann die Stimulation mit TNF zu völlig unterschiedlichen, zum Teil gegensätzlichen Konsequenzen führen. TNF kann ebenso die Zelldifferenzierung und Proliferation wie Apoptose auslösen (Hehlhans und Pfeffer, 2005). Apoptose kann vor allem bei Tumorzellen *in vitro* beobachtet werden, auch wenn es Tumorzelllinien gibt, die gegenüber einer Stimulation mit TNF unempfindlich sind (Ndinya-Achola *et al.*, 1986). Eine zentrale Rolle kommt TNF durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und damit bei proinflammato-

torischen Immunantworten zu (Aggarwal, 2003). Die entzündungsmediierende Eigenschaft von TNF ist auch der Grund, warum TNF nur sehr bedingt zur Behandlung von Tumoren geeignet ist, da eine systemische Verabreichung von TNF zum septischen Schock führen würde (Fiers, 1991; Feinberg *et al.*, 1988). Des weiteren ist TNF auch bei allergischen Reaktionen, Asthma, Autoimmunerkrankungen und Organabstoßungen beteiligt (Aggarwal, 2003). Bei der Abwehr von Pathogenen ist TNF vielfältig involviert, z.B. durch Apoptose-induktion in vireninfizierten Zellen (Tortorella *et al.*, 2000).

### **1.3 TNF-Rezeptoren**

Seine vielfältigen Funktionen erfüllt TNF durch Aktivierung des TNF-Rezeptors 1 (TNF-R1) und TNF-Rezeptors 2 (TNF-R2). Die beiden Rezeptoren sind Prototypen der inzwischen 29 Rezeptoren umfassenden TNF-Rezeptor-Superfamilie (Hehlgans und Pfeffer, 2005). Die Mitglieder dieser Familie besitzen als gemeinsames Merkmal ein bis sechs, die beiden TNF-Rezeptoren jeweils vier cysteinreiche Wiederholungen in ihrer extrazellulären Domäne (Naismith und Sprang, 1998). Zwischen den TNF-Rezeptoren gibt es in vielerlei Hinsicht Unterschiede. Während der TNF-R1 bis auf wenige Ausnahmen, wie z.B. Erythrozyten, auf der Oberfläche aller Zellen konstitutiv exprimiert wird, findet man den TNF-R2 hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems, wo seine Expression streng reguliert wird (Aggarwal, 2003). Auch in der Affinität für lösliches und membrangebundenes TNF unterscheiden sich beide Rezeptoren. Der TNF-R1 kann von beiden, besonders aber von löslichem TNF, aktiviert werden, wohingegen nur membranständiges TNF zu einer vollen Aktivierung des TNF-R2 führt (Grell *et al.*, 1995). Weiterhin besitzt der TNF-R1 eine Todesdomäne (DD), der TNF-R2 hingegen nicht (Wajant *et al.*, 2003). Beiden Rezeptoren gemeinsam ist, dass sie über keinerlei katalytische Aktivität verfügen und nach Aktivierung durch TNF Proteine rekrutieren, welche die jeweilige Signalkaskade in Gang setzen. Während die Signaltransduktion des TNF-R1 schon relativ gut untersucht ist, weiß man über die des TNF-R2



vergleichsweise wenig. In manchen Zellen, z.B. T-Zellen, scheint die Stimulation von TNF-R2 proliferativ zu wirken, in anderen Fällen unterstützt möglicherweise der TNF-R2 synergistisch die apoptotische Signalkaskade des TNF-R1, wobei es über den Mechanismus dieses Prozesses unterschiedliche Auffassungen gibt (MacEwan, 2002). Eine Stimulation des TNF-R1 durch TNF kann neben der Apoptoseinduktion auch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B oder der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), wie JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38, zur Folge haben (Wajant *et al.*, 2003). Die Signaltransduktion des TNF-R1 wird im Folgenden näher beschrieben.

### 1.3.1 Die Signaltransduktion des TNF-R1

Der TNF-R1 ist ein 55kDa großes Typ I-Transmembranprotein, welches an der Zellmembran trimerisiert vorliegt. Die Zusammenlagerung der einzelnen Rezeptormoleküle kommt dabei über eine homophile Interaktion der extrazellulären *preligand assembly domain* (PLAD) zustande (Chan *et al.*, 2000). Die Bindung des trimeren Liganden führt zu einer Konformationsänderung des intrazellulären Teils des TNF-R1 (Chen und Goeddel, 2002). Durch die Konformationsänderung können an die Todesdomäne des TNF-R1, die sich kurz vor dem C-Terminus befindet, Adapterproteine rekrutiert werden. Lange Zeit wurde angenommen, dass im inaktiven Zustand das Protein SODD (*silencer of death domain*) die Todesdomäne maskiert, um eine Selbstaktivierung des TNF-R1 zu unterbinden (Jiang *et al.*, 1999). Allerdings zeigten inzwischen Experimente, dass in SODD-defizienten Zellen die Signaltransduktion des TNF-R1 unverändert abläuft (Endres *et al.*, 2003).

Nach Aktivierung des TNF-R1 wird an die Todesdomäne TRADD (*TNF-receptor associated death domain protein*) rekrutiert (Hsu *et al.*, 1995). TRADD stellt die zentrale Weiche in der Signalkaskade des TNF-R1 dar. Zunächst gibt es die Möglichkeit, dass im nächsten Schritt TRAF-2 (*TNF-receptor associated factor-2*) und die Serin-Threonin-Kinase RIP-1 (*receptor interacting protein-1*) an TRADD binden (Hsu *et al.*, 1996a). TRAF-2 gehört einer Proteingruppe von

inzwischen sechs bekannten Vertretern an, die jeweils an unterschiedliche Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie binden können (Arch *et al.*, 1998). RIP-1 und TRAF-2 ermöglichen zusammen die Rekrutierung und Aktivierung des Proteinkinase-Komplexes IKK (*I- $\kappa$ B kinase*) (Devin *et al.*, 2000). IKK phosphoryliert den Inhibitor von NF- $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) und markiert diesen damit für die Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau im Proteasom (Delhase *et al.*, 1999). Nach dem Entfernen von I- $\kappa$ B von NF- $\kappa$ B kann NF- $\kappa$ B in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktor verschiedener Gene fungieren. Die Rekrutierung von TRAF-2 und RIP-1 ermöglicht zusätzlich auch die Aktivierung von MAP-Kinasen. So konnte gezeigt werden, dass TRAF-2 für die TNF-induzierte Aktivierung von JNK verantwortlich ist (Natoli *et al.*, 1997). Dies geschieht durch Aktivierung vorgeschalteter Kinasen, zum Teil auch unter der Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Gotoh und Cooper, 1998; Tournier *et al.*, 2001). Die Aktivierung von JNK hat wiederum die verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie c-Jun und AFT2, zur Folge (Chang und Karin, 2001). Für die Aktivierung von p38, einer anderen MAP-Kinase, ist neben TRAF-2 auch RIP-1 notwendig (Yuasa *et al.*, 1998). Zu den vielfältigen Funktionen von p38 gehört neben der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ATF2 und CREB (Martin-Blanco, 2000), auch die Verstärkung der IL-6-Produktion (Beyaert *et al.*, 1996; Winzen *et al.*, 1999) und vermutlich eine Beteiligung an der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Vanden Berghe *et al.*, 1998).

Während eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen die Expression generell proinflammatorischer, proliferativer und antiapoptotischer Proteine zur Folge hat, kann bei der Signaltransduktion des TNF-R1 alternativ auch Apoptose durch Bindung von FADD an TRADD induziert werden (Hsu *et al.*, 1996b). Wie im Fall der Fas-Signaltransduktion wird im nächsten Schritt Caspase-8 an FADD rekrutiert, die daraufhin autokatalytisch aktiv wird. Der so entstandene DISC des TNF-R1 besteht also im Vergleich zu dem von Fas aus TRADD, FADD und Caspase-8 (vgl. 1.1.2.2). Allerdings konnte durch Immunpräzipitation unter physiologischen Bedingungen im Gegensatz zu Fas die Bindung des DISC an den TNF-R1 noch nicht nachgewiesen werden (Micheau und Tschopp, 2003; Harper *et al.*, 2003). Dies lässt darauf schließen, dass

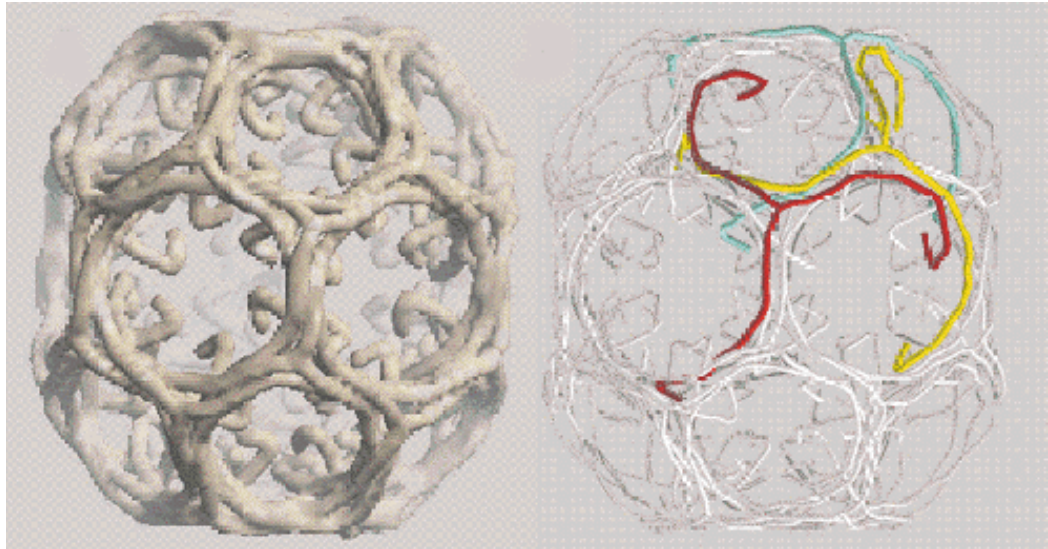
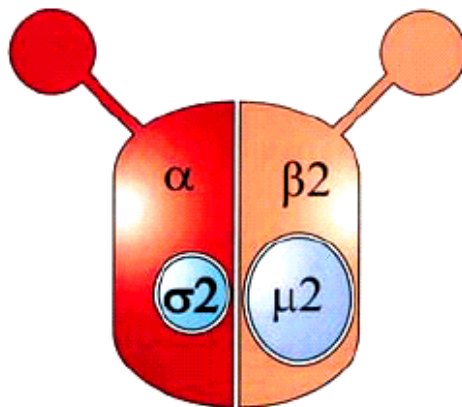
entweder die Assoziation von TRADD an den TNF-R1 vergleichsweise schwach ist oder die Rekrutierung des DISC an den TNF-R1 besondere, noch nicht bekannte Bedingungen benötigt (Wajant *et al.*, 2003). Die bei der DISC-Bildung aktivierte Caspase-8 aktiviert ihrerseits Caspase-3, was letztlich zur Apoptose führt (vgl. 1.1.2). Darüber hinaus kennt man aber noch eine zusätzliche Möglichkeit, durch die Caspase-8 apoptotisch wirkt. Caspase-8 aktiviert auch das Enzym Saure Sphingomyelinase (A-SMase), das aus Sphingomyelinen Ceramide produziert (Wiegmann *et al.*, 1994). Die Saure Sphingomyelinase trägt ihren Namen aufgrund des Aktivitätsoptimums bei niedrigem pH und befindet sich unter anderem in lysosomalen Kompartimenten. Das von ihr generierte Ceramid ist ein Aktivator von Cathepsinen, die im gleichen Zellkompartiment vorkommen (Rodman *et al.*, 1990; Heinrich *et al.*, 1999). Durch Ceramid aktiviertes Cathepsin D transloziert ins Zytoplasma, wo es Bid als Substrat erkennt, es in die trunkierte Form überführt und damit die intrinsische, mitochondrienabhängige Apoptose initiiert (Heinrich *et al.*, 2004).

Obwohl die Signaltransduktion des TNF-R1 schon eingehend untersucht wurde, bleiben aber noch viele Fragen offen, vor allem die nach der Steuerung der Dichotomie der TNF-R1-Signaltransduktion. Welche Voraussetzungen müssen für eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B und damit für das Überleben der Zelle oder für die Induktion von Apoptose gegeben sein? Ansätze zur Beantwortung dieser Frage lieferten Studien von Schütze *et al.*, die zeigen konnten, dass eine Internalisierung des TNF-R1 für die Apoptoseinduktion unerlässlich ist (Schütze *et al.*, 1999). Da Zellmembranrezeptoren vorwiegend clathrinvermittelt endozytiert werden, soll darauf im Folgenden näher eingegangen werden.

## 1.4 Die clathrinvermittelte Endozytose

Endozytose bezeichnet die Gesamtheit der Prozesse, durch die Zellen mit Hilfe aus ihrer Membran gebildeten Vesikeln Moleküle und Partikel internalisieren können (Conner und Schmid, 2003). Mittels Endozytose ist die Zelle damit in der Lage, zentrale Prozesse, wie die Aufnahme von Nährstoffen, die Kommunikation mit anderen Zellen und die Regulation ihrer Homöostase zu steuern (Owen *et al.*, 2004). Von den verschiedenen Endozytoseformen ist die clathrinvermittelte am besten verstanden (Conner und Schmid, 2003). Clathrinvermittelt werden vor allem Zellmembranrezeptoren internalisiert. Durch die Internalisierung von Rezeptoren können diese zu anderen Zellkompartimenten transportiert werden, wo sie evtl. modifiziert, degradiert oder für einen späteren Rücktransport zur Zelloberfläche bereitgestellt werden (van der Goot und Gruenberg, 2002).

Clathrin ist ein Proteinkomplex, aufgebaut aus einer leichten, ca. 30kDa großen und einer schweren, ca. 180kDa großen Kette (Kirchhausen und Harrison, 1981; Ungewickell und Branton, 1981). Die Kombination aus drei schweren und drei leichten Ketten führt zunächst zur Bildung einer charakteristischen dreibeinigen Struktur, des Triskelions. Die weitere Zusammenlagerung von Triskelions ergibt einen Käfig aus Penta- und Hexagonen, der das entstehende Vesikel umgibt (Abb. 1A) (Kirchhausen, 2000). Clathrin interagiert mit mehreren Adapterproteinen, die es einerseits an die Zellmembran rekrutieren und es andererseits mit dem zu endozytierenden Protein verbinden (Kirchhausen, 1999). Je nachdem, um welches Protein es sich dabei handelt, sind an diesen Prozessen andere Adapterproteine beteiligt. Die Clathrin-Ummantelung von Vesikeln hat damit einerseits die Funktion, das entstehende Vesikel zu stabilisieren (Nossal, 2001; Ford *et al.*, 2002) und andererseits das Vesikel zu markieren und so die Richtung des intrazellulären Transports vorzugeben (Owen *et al.*, 2004).

**A****B****Abb. 1 Clathrin und AP-2**

(A) Computer-generierte Darstellung des Clathrinkäfigs nach Auswertung kryomikroskopischer Daten. Farbig hervorgehoben sind einzelne Triskelions. (Nach Kirchhausen 2000, verändert)

(B) Schematische Darstellung des AP-2 (Mousavi *et al.*, 2004)

Zu den wichtigsten Adapterproteinen zählen die Mitglieder der AP (*adaptor protein*)-Familie, von denen man momentan vier, AP-1 bis AP-4, kennt (Robinson und Bonifacino, 2001). AP-2 ist für die Internalisierung zellmembranständiger Proteine wichtig (Robinson, 1987). Seine Deletion führt bei Mäusen zu einer frühen Lethalität in der Embryogenese (Mitsunari *et al.*, 2005). AP-2 ist ein Proteinkomplex, bestehend aus den vier Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta 2$  (jeweils 100kDa),  $\mu 2$  (50kDa) und  $\sigma 2$  (16kDa) (Abb. 1B) (Kirchhausen, 1999). Die  $\alpha$ - und  $\beta 2$ -Untereinheit bestehen jeweils aus einer großen und kleinen Domäne,

die aufgrund ihres Aussehens auch als „Kopf“ und „Ohr“ bezeichnet werden und flexibel miteinander verbunden sind (Heuser und Keen, 1988). An die  $\alpha$ -Kopfdomäne ist die  $\sigma 2$ -Untereinheit assoziiert und an die  $\beta 2$ -Kopfdomäne die  $\mu 2$ -Untereinheit. Den Untereinheiten des AP-2-Komplexes kommen verschiedene Aufgaben zu. Die  $\beta 2$ -Untereinheit bindet mit beiden globulären Domänen an Clathrin (Owen *et al.*, 2000; ter Haar *et al.*, 2000). In der  $\beta 2$ -Untereinheit ist dazu ein kanonisches Erkennungsmotiv für Clathrin enthalten, die sogenannte Clathrinbox, bestehend aus der Aminosäuresequenz LLpL(-), wobei p eine polare und (-) eine negativ geladene Aminosäure bezeichnet (Kirchhausen, 2000). Die Ohrdomäne von  $\beta 2$  rekrutiert zudem zusammen mit der  $\alpha$ -Ohrdomäne eine Reihe weiterer akzessorischer Proteine, die für die Endozytose ebenfalls benötigt werden. Die  $\alpha$ -Kopfdomäne und  $\mu 2$  besitzen beide Bindungsstellen für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), mittels derer der AP-2-Komplex mit der Zellmembran verknüpft wird (Gaidarov und Keen, 1999). Zellmembranproteine, die clathrinvermittelt internalisieren, besitzen eine spezifische Sequenz, die von AP-2 erkannt wird. Die Aminosäuresequenz kann dabei die Form YXX $\Phi$ , D/EXXXLL oder NPXY haben, oder die Markierung für AP-2 erfolgt über eine Ubiquitinierung (Owen *et al.*, 2004). Am besten ist die Erkennung durch das Motiv YXX $\Phi$  untersucht, an das die  $\mu 2$ -Untereinheit bindet (Ohno *et al.*, 1995). Die Interaktion von  $\mu 2$  mit dem zu internalisierenden Protein wird über eine Phosphorylierung von  $\mu 2$  durch die Kinase AAK1 (*adaptor-associated kinase-1*) reguliert (Olusanya *et al.*, 2001). Man nimmt an, dass die Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung von  $\mu 2$  führt, die eine Bindung an das YXX $\Phi$ -Motiv ermöglicht (Collins *et al.*, 2002; Conner und Schmid, 2002). AP-2 ist nicht das einzige Protein, das Clathrin an die Zellmembran rekrutieren kann. Es gibt mindestens noch zwei weitere Proteine, die dazu in der Lage sind: AP180 und Epsin. AP180 ist ein Monomer, das sowohl an AP-2, Clathrin als auch an PIP<sub>2</sub> binden kann (Tebar *et al.*, 1999; Ford *et al.*, 2001). Wahrscheinlich unterstützt es AP-2 in seiner Funktion, denn Experimente konnten zeigen, dass in Zellen, die entweder nur AP-2 oder AP180 exprimieren, Clathrin immer noch an die Membran rekrutiert wird, allerdings mit einer verlangsamten Kinetik (Hao *et al.*, 1999). Epsin bindet

ebenfalls an Clathrin, AP-2 und PIP<sub>2</sub> und verfügt zudem über eine weitere Sequenz zur Erkennung von Ubiquitin (Itoh *et al.*, 2001; Hofmann und Falquet, 2001).

Die Frage, wie nach anfänglicher Rekrutierung von Clathrintriskelions eine dreidimensionale Käfigstruktur entsteht, ist noch ungelöst. Ein Modell, nach dem zunächst eine Ebene aus Hexagonen gebildet wird, die durch den Austausch einzelner Hexagone gegen Pentagone eine sphärische Struktur erhält (Pearse und Bretscher, 1981), wird aus unterschiedlichen Gründen angezweifelt (Kirchhausen, 2000). Sicher scheint nur, dass der Clathrinkäfig bis zu seiner Vollendung mehreren Umbauten unterworfen wird (Jin und Nossal, 1993). Ebenfalls ungeklärt ist bis zum jetzigen Zeitpunkt, wie genau die Krümmung der Zellmembran zustande kommt, um eine clathrinbedeckte Invagination der Zellmembran (*clathrin-coated pit*) zu erreichen. Durch die Rekrutierung von Clathrin an die Zellmembran allein scheint dieser Prozess nicht möglich zu sein. Für ihn werden noch weitere Proteine benötigt, unter denen Epsin eine zentrale Rolle zukommt, indem es initial eine Krümmung der Zellmembran durch Insertion einer Helixstruktur in die Lipiddoppelschicht verursacht (Ford *et al.*, 2002). Für die weitergehende Invagination der Zellmembran scheint dann ein Zusammenspiel anderer Proteine wichtig zu sein. So führt eine Blockierung von Endophilin zu einem Abbruch der Zellmembrankrümmung in einem frühen Stadium der Entstehung von *clathrin-coated pits* (Ringstad *et al.*, 1999). Ebenso wird für das Fortschreiten der Vesikelbildung die Rekrutierung von Dynamin durch Amphyphysin an Clathrin und nachfolgend die GTPase-Funktion von Dynamin benötigt (Hill *et al.*, 2001).

Von Dynamin nimmt man zudem an, dass es die Abtrennung des Vesikels von der Zellmembran entweder selbst, durch einen chemisch-mechanischen Prozess (Hinshaw und Schmid, 1995; McNiven, 1998) oder durch die Rekrutierung von Endophilin an den „Hals“ des entstehenden Vesikels ermöglicht. Im letzteren Fall könnte Endophilin dann aufgrund seiner Transferaseaktivität die Zusammensetzung der Lipide ändern und damit über eine Krümmung der Membran das Vesikel abschnüren (Schmidt *et al.*, 1999; Kozlov, 2001). In einem dritten Szenario wird diskutiert, ob Dynamin nicht auch

durch Bindung an das Aktinzytoskelett die Invagination und Freisetzung von *clathrin-coated vesicles* ermöglicht (Shupliakov *et al.*, 2002; Lee und De Camilli, 2002).

Zur Fusion mit einem anderen Zellkompartiment muss die Clathrinhülle des Vesikels wieder entfernt werden. Im Gegensatz zum Zusammenbau, der spontan ohne Energieaufwand abläuft, ist der Prozess des Auflösens des Clathrinkäfigs energieaufwendig (Crowther und Pearse, 1981). Demzufolge sind am *uncoating* des Vesikels Proteine mit ATPasefunktion beteiligt. Eines von ihnen ist das Chaperon Hsc70 (*heat shock protein 70*) (Chappell *et al.*, 1986), ein Mitglied der Hsp70-Familie, dessen Expression man als zelluläre Antwort auf eine Temperaturerhöhung kennt (Kiang und Tsokos, 1998). Hsc70 benötigt als Kofaktor Auxilin, ein Protein, das man zu der Gruppe der *J-domain containing proteins*, kurz J-Proteine, zählt (Ungewickell *et al.*, 1995). Auxilin gewährleistet dabei die Rekrutierung von Hsc70 an Clathrin in der Anwesenheit von ATP. Unter der nun erfolgenden Spaltung von ATP zu ADP + P dissoziiert Auxilin, und es entsteht ein Komplex aus Hsc70-ADP und Clathrin, was zu einer Dissoziation von Clathrintriskelions führt (Jiang *et al.*, 1997). Wird nun ADP gegen ATP ausgetauscht, kommt es zu keiner weiteren Dissoziation von Triskelions, und der Komplex aus Hsc70-ATP und Clathrin steht für einen neuen Käfigzusammenbau zur Verfügung, womit der Kreislauf der clathrinvermittelten Endozytose geschlossen wird (Jiang *et al.*, 2000).



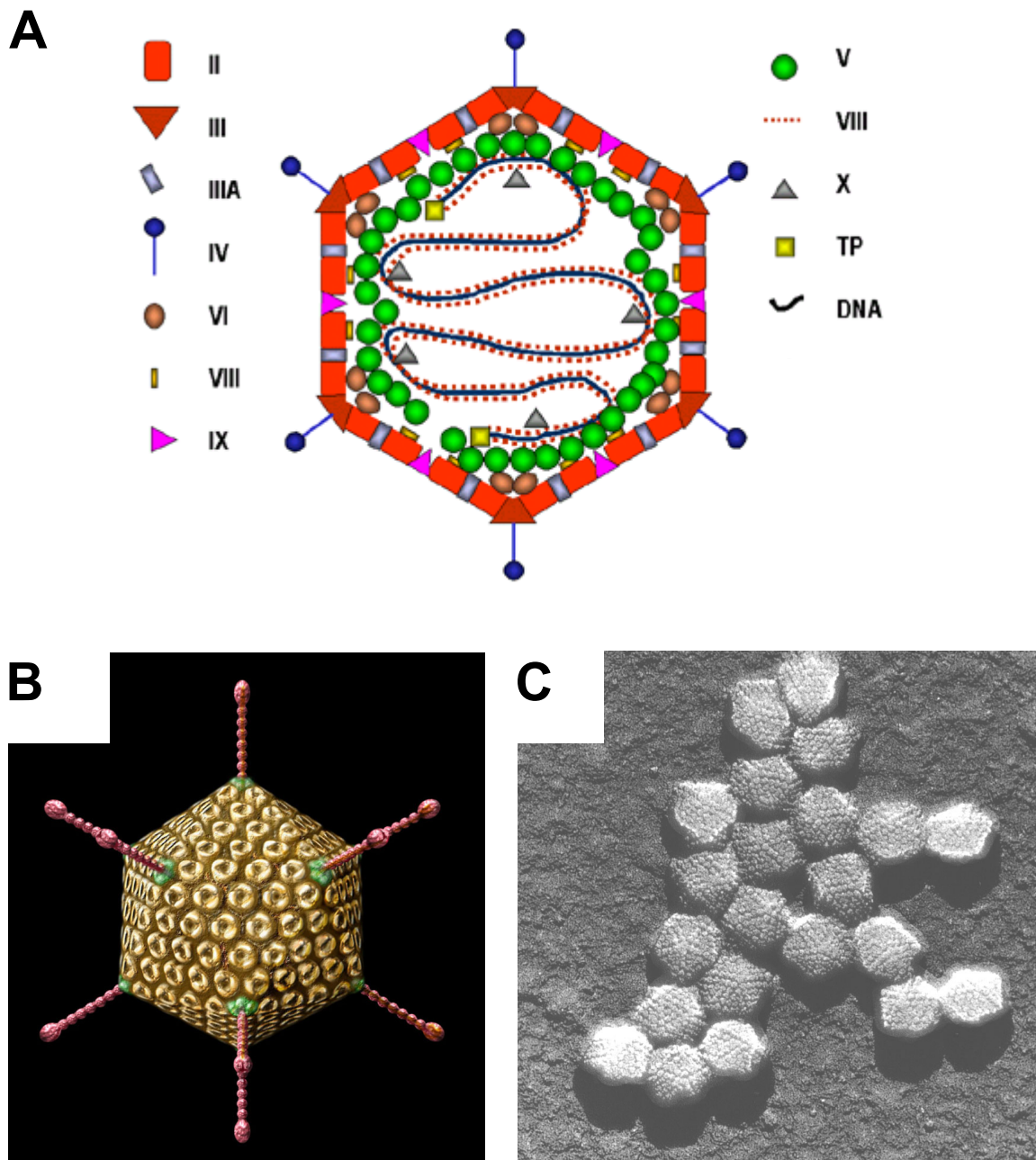
## 1.5 E3-14.7K - ein Inhibitor der TNF-induzierten Apoptose

### 1.5.1 Biologie der Adenoviren

Viren sind „Zellschmarotzer“, die sich außerhalb von Zellen nicht replizieren können und über keinen eigenen Stoffwechsel verfügen, was seit ihrer Entdeckung zu Diskussionen darüber führt, ob sie überhaupt als lebend einzustufen sind. Je nach Virus wird die Erbinformation in einzel- oder doppelsträngiger RNA oder DNA kodiert. Adenoviren besitzen linearisierte doppelsträngige DNA. Ihren Namen erhielten sie, nachdem man sie Mitte des vergangenen Jahrhunderts aus Zellen der Rachenmandeln, der Adenoiden, isoliert hatte (Rowe *et al.*, 1953). Bis heute wurden mehr als 100 verschiedene Adenoviruspezies in Säugetieren, Reptilien und Vögeln gefunden, von denen jede einen individuellen Aufbau und eine eigene chemische Zusammensetzung aufweist (Leen *et al.*, 2006). Die sechs humanen Adenoviruspezies (A-F) werden aufgrund von Homologievergleichen ihrer DNA, ihrer Hämagglutininierungseigenschaften und des onkogenen Potentials in Ratten in 51 verschiedene Serotypen unterteilt, von denen 2 und 5 (Ad2 und Ad5) der Spezies C am besten untersucht sind (Leen *et al.*, 2006). Adenoviren lösen hauptsächlich Krankheitssymptome in respiratorischen Geweben aus, eine Infektion der Augen kann zur Keratokonjunktivitis führen. Adenoviren sind in der Lage, nach der Erstinfektion noch mehrere Jahre im Körper zu persistieren, was sie wahrscheinlich in Epithelzellen der Mandeln tun (Horwitz, 2004). Normalerweise sind adenovirale Infektionen klinisch nicht relevant, können es aber werden, falls die infizierten Personen aufgrund z.B. einer HIV-Infektion oder Behandlung mit Medikamenten immunsupprimiert sind. Befriedigende antiadenovirale Therapien gibt es bis heute nicht, auch wenn antivirale Präparate, wie Cidovir, in einem Teil der Patienten erfolgreich angewendet wurden (Yusuf *et al.*, 2006).

Adenoviruspartikel (Abb. 2) besitzen eine ikosaedrische Form von ungefähr 90nm Durchmesser und im Fall von Ad2 eine Masse von  $15 \times 10^4$  kDa, von denen  $2,2 \times 10^4$  kDa auf die enthaltene DNA entfällt (Stewart *et al.*, 1991; van

Oostrum und Burnett, 1985). Die Partikel besitzen keine zusätzliche Membranhülle (*envelope*), sondern bestehen aus einem Proteinkapsid, welches die DNA umgibt. Man kennt 11 Strukturproteine, die in der Reihenfolge ihrer Größe mit Polypeptid II bis XII bezeichnet werden (Stewart und Burnett, 1995). Die zwanzig Dreiecke des Ikosaeders werden aus jeweils 12 Trimeren des Polypeptids II, Hexon genannt, gebildet. Jede Ecke des Ikosaeders, an der jeweils fünf Dreiecke zusammenlaufen, besteht aus einem Pentamer des Polypeptids III, der Pentonbasis, auf dem das Fiberprotein, das trimerisierte Polypeptid IV, aufsitzt (Pereira *et al.*, 1968; Stewart *et al.*, 1991; Mautner und Pereira, 1971). Neben Hexon, der Pentonbasis und dem Fiberprotein sind am Kapsidaufbau noch Polypeptid IIIa, VI, VIII und IX beteiligt. Die übrigen Strukturproteine erfüllen andere Aufgaben, wie das Anheften der DNA an die Kapsidinnenseite oder die Stabilisierung der DNA.



## Abb. 2 Struktur von Adenoviruspartikeln

(A) Schematische Darstellung eines Adenoviruspartikels

Mit römischen Ziffern angegeben sind die verschiedenen Strukturproteine. (II: Hexon, III: Pentonbasis; IV: Fiberprotein, TP: terminales Protein) (Narayan, Microbiology and Immunology on-line, University of South Carolina, School of Medicine, <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/para-rsv-aden.htm> (13.12.2006), verändert)

(B) Computertechnische Darstellung eines Adenoviruspartikels

Zu sehen sind u.a. die Pentonbasis (grün) und das Fiberprotein (rot). (Copyright Russell Kightley Media, <http://www.grandarts.com/exhibits/ARockman.html> (13.12.2006))

(C) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Adenoviruspartikeln aus Vögeln

Zu erkennen ist die geometrische Struktur der Partikel. (Nermut, National Institute for Biological Standards and Control, [http://www.tulane.edu/~dmsander/Big\\_Virology/BVDNAadeno.html](http://www.tulane.edu/~dmsander/Big_Virology/BVDNAadeno.html) (13.12.2006))

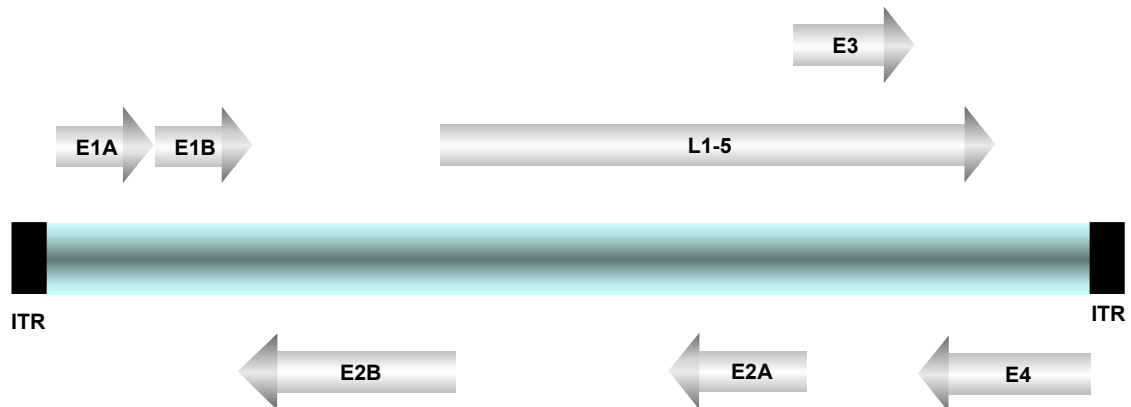
Für die Infektion der Wirtszelle ist das Fiberprotein von entscheidender Bedeutung, mit dem bis auf Spezies B alle Adenoviren an den Coxsackie-Virus B-Adenovirus-Rezeptor (CAR) binden können (Bergelson *et al.*, 1997; Roelvink *et al.*, 1998). CAR gehört zur Ig-Superfamilie und wird im Menschen in vielen Geweben, wie dem Herz, Zentralen und Peripheren Nervensystem, Lunge, Leber und Darm exprimiert (Carson, 2001). CAR ist hier ein Bestandteil von *tight junctions* (Cohen *et al.*, 2001) und kommt daneben in Epithelzellen nur noch in der basolateralen Membran vor, über welche die Primärinfektion stattfindet (Walters *et al.*, 1999). Der Aufenthalt von CAR in *tight junctions* scheint für die Ausbreitung der Infektion wichtig zu sein. Es wird vermutet, dass die Freisetzung von Komplexen, die aus dem Fiberprotein und der Pentonbasis bestehen, aus infizierten Zellen die Oligomerisierung von CAR in *tight junctions* der umgebenden Zellen beeinflusst und zur Auflösung derselbigen führt. Dies würde eine beschleunigte Infektion weiterer Zellen ermöglichen (Walters *et al.*, 2002).

Nach Bindung an CAR werden Adenoviren clathrinvermittelt internalisiert, wozu neben CAR noch weitere Korezeptoren benötigt werden, vor allem  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin, aber auch  $\alpha_5\beta_1$ - und  $\alpha_v\beta_1$ -Integrin (Greber, 2002). Nach der Aufnahme als *clathrin-coated vesicles* gelangt das Virus durch Fusion der Zellkompartimente in frühe Endosomen, aus denen es ins Zytoplasma austreten muss, um nicht im Lysosom abgebaut zu werden. Der Mechanismus dieser Freisetzung ist noch schlecht verstanden, aber neben des sauren pH des Endosoms scheint hierfür die Bindung der Pentonbasis an  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin wichtig zu sein (Wickham *et al.*, 1994). Nachdem das Virus ins Zytoplasma entlassen wurde, gelangt es zum Zellkern, um in diesen seine DNA einzuschleusen. Zum intrazellulären Transport benutzt das Virus Mikrotubuli (Suomalainen *et al.*, 1999), an die es mit Hilfe von Dynein bindet (Kelkar *et al.*, 2004). Damit die DNA in den Zellkern gelangen kann, muss das Kapsid entfernt werden, ein Prozess, der mit der Dissoziation des Fiberproteins schon kurz nach dem Eindringen des Virus in die Zelle beginnt (Nakano *et al.*, 2000). Das auf diese Weise bereits destabilisierte Kapsid bindet an das Kernporenprotein Nup214 (Nucleoporin214). Der proximale Anteil von Hexon wird durch Interaktion mit

dem Histon H1 und den Faktoren Imp $\beta$  und Imp7 nun in den Zellkern importiert, woraufhin das Kapsid vollständig auseinanderfällt. Die Translokation der Viren-DNA in den Zellkern wird danach durch virale Proteine und/oder H1 oder weitere Proteine ermöglicht (Trotman *et al.*, 2001).

Nach dem Transport der viralen DNA in den Zellkern beginnt die Replikation des Virus. Zunächst wird nur ein Teil des ca. 36kbp großen Virengenoms exprimiert, den man als frühe Region (E-Region) bezeichnet, während die Expression des anderen Teils, der späten Region (L-Region), reprimiert wird. Mit dem Beginn der Replikation der Viren-DNA werden dann hauptsächlich die späten Gene, die vor allem für Strukturproteine kodieren, exprimiert (Fessler und Young, 1998). Die frühe Region wird in weitere transkriptionelle Einheiten gegliedert (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 und E4), denen jeweils bestimmte Aufgaben während der Virusreplikation zukommen (Abb. 3). Die zuerst exprimierten E1A- und E1B-Proteine sind für die Transformation der Wirtszelle verantwortlich, indem sie in vielfältiger Weise in die Regulation der zellulären Genexpression eingreifen (Berk, 2005). Entscheidend ist dabei vor allem die Überführung der Zelle von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase durch E1A-Proteine, um die spätere Replikation der Viren-DNA zu ermöglichen (Mahr und Gooding, 1999). Da die Transformation der Wirtszelle zu einer Sensibilisierung gegenüber Apoptoseinduktion sowohl durch Todesrezeptoren als auch durch Aktivierung von p53 führt, blockieren die Produkte der E1B-Region, E1B-19K und E1B-55K, in humanen Zellen beide Pfade (Berk, 2005). E1B-55K ist darüber hinaus für den Transport von mRNAs wichtig (Gabler *et al.*, 1998). Die E2-Region kodiert für Proteine, die für die Virenreplikation benötigt werden. Zu ihnen gehören eine DNA-Polymerase, das DNA-Bindeprotein und das terminale Protein (Caravokyri und Leppard, 1996). Die Produkte der E3-Region haben die Funktion, mögliche Immunantworten des Wirts zu unterdrücken (Horwitz, 2004). Proteine der E4-Region schließlich spielen eine Rolle bei der Regulation der viralen und zellulären Genexpression und bei der Reparatur von DNA (Weitzman, 2005). Die im Zytoplasma synthetisierten Strukturproteine gelangen auf noch ungeklärtem Weg in den Kern, wo der Zusammenbau der Virionen stattfindet (Horwitz *et al.*, 1969). Am Ende des Infektionszyklus wird mit Hilfe des ADP

(*adenovirus death protein*) die Lyse der Zelle auslöst, womit die Viren freigesetzt werden (Tollefson *et al.*, 1996).



**Abb. 3 Genom von Adenoviren**

Vereinfachte Darstellung des Genoms von Adenoviren. Angegeben sind die Bezeichnungen der transkriptionellen Einheiten. Die Pfeillänge entspricht der Länge der Transkriptionseinheit, die Pfeilrichtung der der Transkription. An den beiden Enden des DNA-Moleküls befinden sich die *inverted terminal repeats* (ITR), die für die Replikation und die Verpackung in das Kapsid notwendig sind. (Morgan und Anderson, 1993, verändert)

### 1.5.2 E3-14.7K

Bis auf ADP besitzen die in der E3-Region kodierten Proteine immunmodulatorische Eigenschaften. So verhindert E3-gp19K eine Beladung des MHC-I und damit die Präsentation adenoviraler Peptide (Wold und Gooding, 1989). RID (*receptor internalization und degradation*), ein Komplex aus E3-10.4K und E3-14.5K, erniedrigt die Fas- und TRAILR- Zelloberflächenexpression, so dass die Interaktion mit dem entsprechenden Liganden verhindert wird (Benedict *et al.*, 2001; Shisler *et al.*, 1997). E3-6.7K hat ebenso einen inhibierenden Effekt auf die TNF- und zusammen mit RID die TRAIL-vermittelte Apoptose (Benedict *et al.*, 2001; Moise *et al.*, 2002).

E3-14.7K schließlich ist ein Protein, das man zunächst als Inhibitor der TNF-induzierten Apoptose in C3HA-Zellen identifizierte (Gooding *et al.*, 1988). Später wurde klar, dass E3-14.7K in den meisten Zelllinien als genereller Inhibitor der TNF-induzierten Apoptose anzusehen ist (Gooding *et al.*, 1990).

E3-14.7K ist in den verschiedenen Adenovirustypen hoch konserviert, was seine Wichtigkeit für den Schutz von Adenoviren vor dem Immunsystem des Wirts deutlich macht (Horton *et al.*, 1990). Seit den ersten Studien über E3-14.7K gab es aber bisher nur wenige weitere, die sich mit den Mechanismen der E3-14.7K-vermittelten Apoptoseinhibierung beschäftigten. Zunächst zeigten Ranheim und Kollegen, dass die meisten Mutationen, die sie an E3-14.7K vornahmen, zu einem Funktionsausfall führten, so dass man annehmen kann, dass das gesamte Protein und nicht nur einzelne Domänen für seine Wirkung nötig ist (Ranheim *et al.*, 1993). Später fand man heraus, dass E3-14.7K die TNF-stimulierte Freisetzung von Arachidonsäure, einen Prozess, der mit der TNF-induzierten Apoptose assoziiert ist, verhindert (Krajcsi *et al.*, 1996). Zur weiteren Aufklärung der E3-14.7K-Biologie wurden Interaktionspartner von E3-14.7K identifiziert, die als FIPs (14.7K *interacting proteins*) bezeichnet werden (Li *et al.*, 1997). FIP-1 ist ein GTP-bindendes Protein, das an Bestandteile von Mikrotubuli bindet (Lukashok *et al.*, 2000), FIP-2 besitzt putative Leucin-Zipper-Motive (Li *et al.*, 1998c), bei FIP-3 handelt es sich um ein Homolog des Mausproteins NEMO (Li *et al.*, 1999) und FIP-4 ist identisch mit AIF (Horwitz, 2004). Wie diese Faktoren ins Bild der E3-14.7K-vermittelten Apoptoseinhibierung passen, muss aber noch geklärt werden. Schließlich wurden Strukturanalysen an E3-14.7K durchgeführt, welche zu folgenden Ergebnissen führten: abgesehen von einigen Schleifen besitzt E3-14.7K eine kompakte gefaltete Struktur und Bindungsstellen für divalente Metallkationen. Zudem liegt E3-14.7K wahrscheinlich als Nonamer in adenovirusinfizierten Zellen vor (Kim und Foster, 2002) und befindet sich sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern (Gooding *et al.*, 1990).

## 2 Zielsetzung

Der TNF-R1 ist ein Todesrezeptor, der nach Aktivierung einen Proteinkomplex (DISC) rekrutiert, um Apoptose auszulösen. Für die Apoptoseinduktion spielt die Internalisierung des TNF-R1 eine wichtige Rolle, da Studien zeigen konnten, dass nach einer pharmakologischen Blockierung der TNF-R1-Internalisierung Zellen nicht mehr apoptotisch auf TNF reagieren. In der vorliegenden Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen der TNF-R1-Internalisierung und der Apoptoseinduktion näher untersucht werden. Dazu sollte zunächst das Aminosäuremotiv innerhalb des TNF-R1 identifiziert werden, welches die Internalisierung vermittelt. Anschließend sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Internalisierungsblockierung durch Deletion oder Mutation des gefundenen Internalisierungsmotivs auf die DISC-Rekrutierung und die Apoptoseinduktion ausübt. Da bisher die Rekrutierung des DISC an den TNF-R1 unter physiologischen Bedingungen noch nicht belegt werden konnte, sollte mit einem neuen methodischen Ansatz sowohl der DISC nachgewiesen als auch der Einfluss der TNF-R1-Internalisierung auf die DISC-Rekrutierung untersucht werden.

Das adenovirale Protein E3-14.7K ist ein Inhibitor der TNF-induzierten Apoptose. Der Mechanismus der E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz war bisher noch unklar. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Expression von E3-14.7K in Mauszellen aufgrund einer Blockierung der TNF-R1-Internalisierung zur TNF-Resistenz führt. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob E3-14.7K auch humane Zellen durch eine Blockierung der TNF-R1-Internalisierung vor TNF schützt. Dies sollte sowohl in E3-14.7K-transduzierten humanen Zellen als auch unter den pathophysiologischen Bedingungen einer Infektion humaner Zellen mit Adenoviren untersucht werden.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Zu nicht aufgeführten Materialien siehe die Beschreibung der Methoden in 3.2.

#### 3.1.1 Geräte

Durchflusszytometer	Epics XL MCL, Beckmann Coulter
Heizblock BT 100	Kleinfeld Labortechnik
Mikroskope	LSM 510, Carl Zeiss Leica Fluoreszenzmikroskop DMLS2, Leica Leica Inversionsmikroskop DMIL, Leica
PCR-Thermocycler PTC 200	Bio-Rad

#### 3.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen und Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Merck bezogen.

Agar	LB <sub>0</sub> , 1,5% Agar-Agar
Actinomycin D	Sigma Aldrich
Agarose	Cambrex
Ampicillin	Sigma Aldrich
ATP (100mM)	Fermentas
CHX	Sigma Aldrich
Desoxyribonukleotide (100mM)	Fermentas
DMEM	GIBCO/Invitrogen
Expand High Fidelity DNA Polymerase	Roche Diagnostics
FKS	PAN Biotech
Gentamycin	PAA
LB <sub>0</sub>	1% Caseinpepton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl
Ligasepuffer, 10x konz.	Roche Diagnostics
PCR-Puffer, 10x konz.	Roche Diagnostics

PBS	150mM NaCl, 8mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , gelöst in H <sub>2</sub> O, pH 7,3
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech
Restriktionsenzympuffer, 10 x konz.	siehe Hersteller des jeweiligen Enzyms
RPMI 1640	PAN Biotech
TNF, rekombinant, human	Knoll AG
Trypsin/EDTA	PAN Biotech

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

6-Loch-Platten	Falcon
96-Loch-Platten	Falcon
Kryogefäße, 1,5ml	Nunc
Zellschaber	Sarstedt
Zellkulturflaschen, 157cm <sup>2</sup>	Falcon
Zellkulturschale, 10cm	Falcon
Zellkulturschale, 20cm	Falcon

### 3.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase (10U/µl)	Roche Diagnostics
BamHI (10U/µl)	Roche Diagnostics
DpnI (10U/µl)	Fermentas
Klenow Polymerase (10U/µl)	New England BioLabs
PacI (10U/µl)	New England BioLabs
Sall (10U/µl)	Roche Diagnostics
T4 DNA-Ligase (10U/µl)	Roche Diagnostics
DNA-Polymerase Expand High Fidelity (1U/µl)	Roche Diagnostics
XhoI (10U/µl)	Roche Diagnostics

### 3.1.5 Antikörper

#### a) Primärantikörper

Anti-Aktin	Santa Cruz
Anti-CD120a, FITC	Acris Antibodies GmbH
Anti-Caspase-8	Santa Cruz

Anti-cleaved Caspase-8	Calbiochem
Anti-E2A	zur Verfügung gestellt von Thomas Dobner
Anti-E3-14.7K	zur Verfügung gestellt von Linda Gooding
Anti-FADD	Alexis Biochemicals
Anti-TRADD	Santa Cruz

#### b) Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen IgG, FITC	Molecular Probes
Anti-Kaninchen IgG, HRP	Bio-Rad
Anti-Maus IgG, HRP	Bio-Rad
Anti-Ratte IgG, HRP	Santa Cruz
Anti-Ziege IgG, HRP	Santa Cruz

### 3.1.6 Kits

EndoFree Plasmid Mix Kit (10)	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit (250)	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen
QIAprep SpinMiniprep Kit (250)	Qiagen

### 3.1.7 Primer

TNF-R1 WT 5' BamHI	5'-CTCGGATCCATGGGCCTCTCC ACCGTG-3'
TNF-R1 WT 3' Sall	5'-GTCGACTCTGAGAAGACTGGG CGCGGG-3'
TNF-R1 $\Delta$ DD 5' EcoRI	5'-CTCGAATTCATGGGCCTCTCC ACCGTG-3'
TNF-R1 $\Delta$ DD 3' Sall	5'-CTCGTCGACCTAGAACTCCTT CCAGCGCAACG-3'
TNF-R1 $\Delta$ TRID $\Delta$ NSD 5'	5'-CAGAGCCTAGACACTGATGA CCCCGCG -3'
TNF-R1 $\Delta$ TRID $\Delta$ NSD 3'	5'-GGGGTTGGGGATGGGGTCG GAGGCGAG -3'

### 3.1.8 Zelllinien und Bakterienstämme

H1299	humane Lungenkarzinomzellen
-------	-----------------------------

HEK293	humane embryonale Nierenzellen
HEK 293T	humane embryonale Nierenzellen, durch Insertion des SV 40 T-Antigens aus HEK293-Zellen abgeleitet
TNF-R1/TNF-R2 -/-	TNF-R1/TNF-R2-defiziente immortalisierte Fibroblasten aus murinen Oberschenkelknochen. Zur Verfügung gestellt von Daniela Männel
<i>E. coli</i> XL-1 blue	Stratagene

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Arbeiten mit DNA

#### 3.2.1.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige Agarosegele in 1 x TBE-Puffer (900mM Tris, 900mM Borsäure, 50mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0) mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. Die Beladung der Gele erfolgte nach Mischen der DNA-Proben mit Ladepuffer (Fermentas). Die Elektrophorese wurde in Gelkammern (Power Pac 3000, Bio-Rad) in 1h bei 85V durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Visualisierung auf einem UV-Schirm (Bachhofer).

#### 3.2.1.2 PCR-Mutagenese

Zur Erzeugung der verschiedenen TNF-R1-Konstrukte mit den benötigten Schnittstellen wurde in dieser Arbeit das Verfahren der PCR-Mutagenese eingesetzt. Es wurde jeweils folgender PCR-Ansatz verwendet:

Template-DNA	10ng
Primer 1	200nM
Primer 2	200nM
Desoxyribonukleotide	20mM
PCR-Puffer, 10 x konz.	5µl
DNA-Polymerase	1µl
Aqua bidest.	ad 50µl

Für die PCR wurde das Expand High Fidelity PCR System nach Anleitung des Herstellers eingesetzt.

Das für die PCR als Template-DNA eingesetzte Plasmid wurde mittels eines Verdau mit dem Enzym DpnI aus dem PCR-Ansatz entfernt, um eine spätere Transformation in *E. coli* zu verhindern. Der DpnI-Verdau erfolgte in 1h bei 37°C. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produkts mittels des QIAquick PCR Purification Kit nach Anleitung des Herstellers.

Zur Phosphorylierung von PCR-Produkten wurde folgender Ansatz verwendet:

PCR-Produkt	30µl
ATP (100mM)	1µl
Polynukleotidkinase (PNK)	1µl
PNK-Puffer, 10 x konz.	4µl
Aqua bidest.	4µl

Der Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte eine Aufreinigung mittels des QIAquick PCR Purification Kit nach Anleitung des Herstellers.

### 3.2.1.3 Verdau von Vektor-DNA

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor wurde dieser mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Wurden dabei zwei Restriktionsenzyme verwendet, und war es dabei aufgrund der Pufferbedingungen nicht möglich, beide gleichzeitig einzusetzen, so erfolgten die Verdaue hintereinander mit einer dazwischenliegenden Aufreinigung mittels des QIAquick Gel Extraction Kit nach Anleitung des Herstellers. Der Verdau wurde folgendermaßen angesetzt:

Vektor-DNA	5µg
Restriktionsenzym 1	1µl
Restriktionsenzym 2 (optional)	1µl
Restriktionsenzym-puffer, 10 x konz.	4µl
Aqua bidest.	ad 40µl

Der Verdau wurde in 1,5h bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.1.1). Die verdaute Vektor-DNA wurde danach aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des QIAquick PCR Purification Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Entstanden beim Verdau des Vektors glatte Enden, so wurde die DNA vor dem Auftragen auf das Agarosegel aufgereinigt und anschließend mit 1µl Alkalischer Phosphatase 30min bei 37°C inkubiert.

#### **3.2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren**

Zur Ligation von DNA-Fragmente in Vektoren wurde folgender Ansatz gewählt:

DNA-Fragment + Vektor DNA	bis zu 8µl, im molaren Verhältnis 3:1
T4 DNA-Ligase	1µl
Ligasepuffer, 10 x konz	1µl
Aqua bidest.	ad 10µl

Der Ansatz wurde 24h bei 4°C inkubiert.

#### **3.2.1.5 Transformation**

Die Vektoren mit den jeweiligen DNA-Fragmenten wurden in kompetente Bakterien (hergestellt nach Inoue *et al.*, 1990) des *E. coli*-Stammes XL-1 blue transformiert. Dazu wurden 200µl Bakteriensuspension mit 10µl eines Ligationsansatzes 10min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1,5minütige Inkubation bei 42°C, gefolgt von einer 10minütigen Inkubation auf Eis. Die Bakterien wurden anschließend auf Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **3.2.1.6 Präparation von DNA**

Die Präparation von DNA erfolgte mit dem QIAprep SpinMiniprep Kit und EndoFree Plasmid Mix Kit nach Anleitung des Herstellers.

#### **3.2.1.7 Verifizierung von DNA**

Zur Verifizierung von DNA wurde diese durch die Firma Geneart in Regensburg sequenziert.

### 3.2.1.8 Klonierungen

#### a) TNF-R1 WT

Ausgangspunkt der Klonierung war das Plasmid pEF-Bos, in dem der humane TNF-R1 WT enthalten war. Durch PCR-Mutagenese wurde am 5'-Ende der TNF-R1-DNA eine BamHI-Schnittstelle und am 3'-Ende der TNF-R1-DNA eine Sall-Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Produkt wurde zunächst in einen EcoRV-verdauten pBS-Vektor subkloniert, hieraus nach erfolgter DNA-Präparation mit BamHI/Sall ausgeschnitten und in den BamHI/XhoI-verdauten Vektor pQCXIP (BD Biosciences) kloniert. Der Vektor pQCXIP besaß ursprünglich keine XhoI-Schnittstelle. Sie wurde durch Mutagenese-PCR eingeführt (Ehrenschwender, 2006).

#### b) TNF-R1 $\Delta$ DD

Das Konstrukt TNF-R1  $\Delta$ DD mit den Schnittstellen 5'-EcoRI, 3'-Sall wurde durch Mutagenese-PCR mit den entsprechenden Primern aus der DNA des TNF-R1 WT hergestellt. Anschließend erfolgte eine Subklonierung in pBS und schließlich die in den Zielvektor pQCXIP (BD Biosciences).

#### c) TNF-R1 $\Delta$ TRID

Das Konstrukt TNF-R1  $\Delta$ TRID wurde durch einen BamHI/Sall-Verdau aus dem Vektor prkat geschnitten, in den EcoRV-verdauten Vektor pBS subkloniert und anschließend in den BamHI/Sall-verdauten Vektor pQCXIP (BD Biosciences) ligiert.

#### d) TNF-R1 $\Delta$ TRID $\Delta$ NSD

Zum Erhalt des TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Konstrukts wurde eine inverse PCR des zuvor in den Vektor pBS subklonierten TNF-R1  $\Delta$ TRID-Konstrukts durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, dass die DNA des TNF-R1  $\Delta$ TRID zusammen mit dem Vektor pBS ohne die NSD amplifiziert wurde. Die entstandene lineare DNA wurde durch Ligation zum zirkulären Plasmid geschlossen und das

TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Konstrukt in den Zielvektor pQCXIP (BD Biosciences) kloniert.

e) TNF-R1 YQRA und TNF-R1 AQRW

Die Konstrukte TNF-R1 YQRA und TNF-R1 AQRW waren in Vorarbeiten in den Vektor pCR2.1 kloniert worden. Durch Mutagenese-PCR wurde eine 5'-BamHI- und eine 3'-Sall-Schnittstelle erzeugt. Die PCR-Produkte wurden zunächst in pBS subkloniert und später in den mit BamHI/XhoI verdauten Vektor pQCXIP (BD Biosciences) ligiert.

f) E3-14.7K

Die E3-14.7K-DNA lag im Vektor pLXSN vor. Sie wurde durch einen Verdau mit EcoRI/XhoI ausgeschnitten und in den Vektor pQCXIP (BD Biosciences) ligiert.

### 3.2.2 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. HEK 293T- und H1299-Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin gehalten. TNF-R1/TNF-R2-defiziente Zellen wurden in RPMI mit 10% FKS und 500µg/ml Gentamycin kultiviert.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium verworfen, und die Kulturgefäße wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Inkubation in einer PBS-Lösung mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA. Je nach Bedarf wurden zwei Drittel bis neun Zehntel der Zellen verworfen und die verbliebenen Zellen mit frischem Kulturmedium erneut inkubiert.

Zur dauerhaften Lagerung wurden  $3 \times 10^6$  Zellen nach Waschen mit PBS und Behandlung mit einer PBS-Lösung mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA durch fünfminütige Zentrifugation bei 300 x g pelletiert, in 0,5ml Einfriermedium, bestehend aus FKS mit 5% DMSO, aufgenommen und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryogefäße durch Überschichtung mit Kulturmedium erwärmt und die Zellen 24h in 50ml



Kulturmedium in einem Zellkulturgefäß unter Kulturbedingungen über Nacht inkubiert. Danach wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und danach in frischem Kulturmedium inkubiert.

### **3.2.3 Retroviraler Gentransfer**

Zum retroviralen Gentransfer wurden das RetroMax Retroviral Expression System (Imgenex) und der Expressionsvektor pQCXIP (BD Clontech) verwendet. Siehe zu den folgenden Punkten 3.2.3.1 und 3.2.3.2 auch die Anleitung des Herstellers.

#### **3.2.3.1 Herstellung der Retroviren**

Einen Tag vor Transfektion wurden etwa  $3 \times 10^6$  HEK293T-Zellen in 10cm-Kulturschalen ausgesät (entspricht ca. 70% Konfluenz). 1h vor Transfektion wurde das Medium der Kulturschale gegen 10ml DMEM mit Glutamat (DMEM + GlutaMAX, GIBCO/Invitrogen) gewechselt. Der Expressionsvektor pQCXIP, der das jeweilige TNF-R1-Konstrukt enthielt, wurde zusammen mit dem Vektor pCL-10A1 (RetroMax Retroviral Expression System, Imgenex) in HEK293T-Zellen transfiziert. Jeweils 30µg der beiden Vektoren wurden in einem Gesamtvolumen von 450µl gemischt und danach 50µl 2,5M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugesetzt. Unter Vortexen wurde der Ansatz in 500µl Transfektionspuffer (0,28M NaCl, 10mM KCl, 1,5m  $\text{MNa}_2\text{PO}_4$ , 42mM HEPES, 2% Glukose, pH 7,05) überführt und das gesamte Volumen von 1ml auf eine 10cm-Kulturschale getropft. 6h nach der Transfektion erfolgte ein Wechsel gegen 10ml Kulturmedium (3.2.2).

#### **3.2.3.2 Infektion mit Retroviren**

24h nach Transfektion wurde der Überstand der transfizierten Zellen abgenommen und gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. Zur Erhöhung der Adhäsion der Retroviren an die Zellen wurde das abgenommene Medium mit Polybrenen (Sigma Aldrich, Endkonzentration 8µg/ml) versetzt. Anschließend wurde das Medium mittels eines 0,45µm Filters (PALL Corp.) steril filtriert. Ein Drittel des Mediums wurde als neuer Überstand auf 24h zuvor

in 6-Loch-Platten ausgesäten TNF-R1/TNF-R2-defizienten Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen pro Loch) pipettiert. Das restliche Medium wurde auf Eis inkubiert. Jeweils ein weiteres Drittel wurde nach weiteren 4h gegen das zuvor eingesetzte ausgetauscht. 48h nach Transfektion wurde die Infektion wiederholt und 72h nach Transfektion der zuletzt eingesetzte HEK293T-Überstand gegen frisches Kulturmedium (3.2.2) gewechselt.

### **3.2.3.3 Selektion der retroviral infizierten Zellen**

96h nach Transfektion wurden die retroviral infizierten Zellen mit dem Proteinbiosynthesehemmer Puromycin (Sigma Aldrich) behandelt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit nicht infizierten Zellen ebenfalls mit Puromycin behandelt. Zu Beginn wurde eine Puromycinmenge von  $1,0\mu\text{g/ml}$  eingesetzt, die alle zwei Tage um  $0,5\mu\text{g/ml}$  erhöht wurde. Die Behandlung mit Puromycin wurde eingestellt, wenn alle Zellen der Kontrolle abgestorben waren.

### **3.2.4 Herstellung der Ad5-Mutanten**

#### **3.2.4.1 Ad5 WT und Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K**

Ausgangspunkt für die Erzeugung von Ad5 WT und Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K war der bakterielle Vektor pPG-S2, in den das jeweilige Adenovirusgenom mittels einer PacI-Schnittstelle kloniert worden war. Die hierfür nötigen Arbeiten waren von Peter Groitl durchgeführt worden (Schneider-Brachert *et al.*, 2006). Zur Transfektion in HEK293-Zellen wurde das adenovirale Genom durch einen PacI-Verdau wieder ausgeschnitten. Dazu wurden  $40\mu\text{g}$  DNA in  $100\mu\text{l}$  Gesamtvolumen mit  $10\mu\text{l}$  PacI 3h bei  $37^\circ\text{C}$  verdaut und PacI anschließend durch eine 20minütige Inkubation bei  $65^\circ\text{C}$  inaktiviert. Am Vortag der Transfektion wurden in 6-Loch-Platten  $3 \times 10^5$  Zellen je Loch ausgesät. Pro Loch wurden  $20\mu\text{l}$  des PacI-Verdaus (entspricht  $8\mu\text{g}$  DNA) und  $20\mu\text{l}$  Lipofectamin 2000 (Invitrogen) jeweils mit  $480\mu\text{l}$  DMEM ohne FKS und Antibiotika gemischt, die Lösungen nach 20min vereinigt und damit die Zellen nach Entfernen des Kulturmediums und Waschen mit PBS unter Normalbedingungen 6h inkubiert. Danach wurden die Zellen in Kulturmedium (3.2.2) inkubiert. 72h nach Transfektion wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus den Kulturgefäßen entfernt, durch

10minütiges Zentrifugieren bei 1000 x g pelletiert und in DMEM ohne FKS und Antibiotika resuspendiert. Durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Wiederauftauen wurden die Zellen aufgeschlossen und durch 10minütiges Zentrifugieren bei 10000 x g die Zellreste pelletiert. Der abgenommene Überstand enthielt die Adenoviren. Zur Gewinnung hochtitriger Virensuspensionen wurden  $8 \times 10^7$  Zellen, aufgeteilt auf 8 20cm-Schalen, mit einer MOI 10 infiziert (zur Bestimmung von Virentitern siehe 3.2.5). Zur Infektion wurde das Medium der am Vortag ausgesäten Zellen entfernt und die Virensuspension entweder unverdünnt oder verdünnt mit DMEM ohne FKS und Antibiotika auf die Zellen pipettiert. Dabei wurde mit soviel Gesamtvolumen gearbeitet, dass die Zellen gerade bedeckt waren. Die Zellkulturgefäße wurden jede Stunde einmal kurz geschwenkt. Nach 6h wurden die Zellkulturgefäße mit Medium (3.2.2) auf das übliche Volumen aufgefüllt. Die infizierten Zellen wurden nach weiteren 48h auf die beschriebene Weise aufgeschlossen.

#### **3.2.4.2 Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup>**

Suspensionen mit Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup> wurden von Thomas Dobner zur Verfügung gestellt.

#### **3.2.5 Bestimmung des Virentiters**

Zur Bestimmung des Titors einer Virensuspension wurde diese in DMEM ohne FKS und Antibiotika 1:100 bis 1:10<sup>7</sup> verdünnt. 1ml der verdünnten Suspension wurde zur Infektion von  $3 \times 10^5$  H1299-Zellen, die zuvor in ein Loch einer 6-Loch-Platten ausgesät worden waren, eingesetzt (zur Infektion siehe 3.2.4.1). 36h nach Infektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 2min bei -20°C mit Methanol permeabilisiert und fixiert. Nach Entfernen des Methanols und Waschen mit TBSBG (100mM Tris-HCl, 700mM NaCl, 15mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 350mM Glycin, 0,2% Tween 20, 2,5% BSA) wurden die Zellen mit einem gegen das adenovirale Protein E2A gerichteten Antikörper 4h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit TBSBG gewaschen, mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper 2h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und erneut mit TBSBG

gewaschen. Nun erfolgte eine Zählung der fluoreszierenden Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Dabei wurde ein Loch gewählt, in dem ungefähr die Hälfte der Zellen fluoreszierte. Bei einer 32fachen Vergrößerung wurden die fluoreszierenden Zellen in 10 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern gezählt und der Mittelwert gebildet. Die Anzahl der Viren pro ml ergab sich aus dem Produkt des Mittelwerts der fluoreszierenden Zellen mit dem eingesetzten Verdünnungsfaktor und dem Faktor 3000 (das Gesichtsfeld bei 32facher Vergrößerung entspricht 1/3000 der Fläche eines Lochs einer 6-Loch-Platte).

### **3.2.6 Bestimmung der Infektionseffizienz**

$3 \times 10^5$  H1299-Zellen wurden pro Loch in eine 6-Loch-Platte ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI 100 infiziert (zur Infektion siehe 3.2.4.1). Nach 24h wurden die Zellen, wie in 3.2.5 beschrieben, immunfluoreszenztrisch gefärbt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Infektionseffizienz mittels konfokaler Lasermikroskopie.

### **3.2.7 Bestimmung der Oberflächenexpression der TNF-R1-Konstrukte**

$5 \times 10^6$  Zellen wurden mittels eines Zellschabers aus den Kulturgefäßen entnommen, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 30min in PBS mit einem gegen den TNF-R1 gerichteten FITC-gekoppelten Antikörper im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal gewaschen und die Fluoreszenz der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle diente ein parallel geführter Ansatz, bei dem die Zellen in PBS allein inkubiert worden waren.

### **3.2.8 Biotin-TNF/Avidin-FITC-Internalisierung**

#### **3.2.8.1 Biotin-TNF/Avidin-FITC-Internalisierung in Abhängigkeit des TNF-R1-Konstrukts**

Am Vortag wurden in einer 6-Loch-Platte  $3 \times 10^4$  Zellen pro Loch auf fibronectinbeschichteten Deckgläsern (BD Biosciences) ausgesät. Je Deckglas wurde 1,25µl Biotin-TNF mit 1,25µl Avidin-FITC (Human TNF- $\alpha$ /TNFSF1A

Biotinylated Fluorokine Kit, RD Systems) im Dunkeln 1h vorinkubiert. Danach wurde mit eiskaltem PBS auf 50µl Endvolumen pro Deckglas aufgefüllt. 15min vor der Experimentdurchführung wurde die 6-Loch-Platte auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Deckgläser mit 50µl der Biotin-TNF/Avidin-FITC-Lösung auf Eis. Danach wurden die Deckgläser nach Waschen in eiskaltem PBS in eine 6-Loch-Platte mit vorgewärmtem Medium überführt, 30min bei 37°C inkubiert, in eiskaltem PBS gewaschen und in einer 7%igen Formaldehydlösung (verdünnt mit PBS aus 37% Formaldehyd, Merck) 15min fixiert. Nach erneutem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Deckgläser mit Hilfe eines Eindeckelmediums (Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories) auf Objektträger aufgebracht. Als Kontrolle wurden Zellen eingesetzt, die durchgängig bei 4°C inkubiert wurden. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops.

#### **3.2.8.2 Biotin-TNF/Avidin-FITC-Internalisierung in Abhängigkeit der Ad5-Mutante**

In einer 6-Lochplatte wurden pro Loch  $3 \times 10^4$  Zellen auf fibronectin-beschichteten Deckgläsern (BD Biosciences) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen analog zu 3.2.4.1 mit einer MOI 100 mit den angegebenen Viren infiziert. 24h später erfolgte die Darstellung der TNF-R1-Internalisierung in Abhängigkeit der Ad5-Mutante wie in 3.2.8.1 beschrieben.

#### **3.2.9 Isolierung magnetisch markierter Zellfraktionen**

$7,5 \times 10^7$  Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers aus den Kulturflaschen entnommen und in 250µl eiskaltem PBS aufgenommen. Anschließend wurden 100µl (400ng) Biotin-TNF (Human TNF- $\alpha$ /TNFSF1A Biotinylated Fluorokine Kit, RD Systems) zugegeben, die Zellen 1h auf Eis inkubiert, 200µl MACS Streptavidin Mikropartikel (Streptavidin Microbeads, Miltenyi Biotec) zugesetzt und die Zellen nochmals 1h auf Eis inkubiert. Nun erfolgte eine 30minütige Inkubation der Zellen bei 37°C. Danach wurden die Zellen durch 10minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 1000 x g pelletiert und in 250µl Homogenisierungspuffer (0,25M Sucrose, 15mM HEPES, 0,5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) aufgenommen.

Nach Zugabe von Glaskugeln und Proteaseinhibitoren (Roche Complete, Roche Diagnostics) erfolgte durch 10minütiges Vortexen auf Eis die Homogenisierung der Zellen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der erhaltene Überstand zur Isolierung der magnetischen Fraktionen in einer *Free-Flow*-Magnetkammer eingesetzt (Tchikov *et al.*, 2001). Die Isolierung der magnetischen Fraktionen wurde von Vladimir Tschikov durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne Inkubation bei 37°C homogenisiert wurden.

### **3.2.10 Zytotoxizitätstest**

#### **a) Durchlichtmikroskopische Analysen TNF-stimulierter Zellen**

Am Vortag wurden in einer 96-Loch-Platte pro Loch in 100µl Kulturmedium (3.2.2)  $1,5 \times 10^4$  Zellen ausgesät. Die Zellen wurden zunächst 2h mit 2µg/ml Actinomycin D inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 100ng/ml TNF und eine vierstündige Inkubation der Zellen bei 37°C. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit Actinomycin D allein behandelt worden waren. Anschließend wurden die Zellen im Durchlichtmikroskop fotografiert (Agfa Curix 60, Agfa Photo GmbH). Die Aufnahmen wurden nachfolgend digitalisiert (Calibrated Densitometer GS-800, Bio-Rad).

#### **b) Kristallviolettfärbung**

Aussäen und Stimulation der Zellen mit Actinomycin D wurden, wie in 3.2.10.1 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden mit den angegebenen Mengen TNF 4h behandelt. Nach der Stimulation wurde das Medium aus den Löchern abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde pro Loch 50µl Kristallviolettlösung (0,5% Kristallviolett, 4% Formaldehyd, 30% Ethanol, 30mM NaCl) zugegeben. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Kristallviolettlösung verworfen und die 96-Loch-Platte mit bidestilliertem Wasser gespült. Die 96-Loch-Platte wurde bei 60°C 30min getrocknet. Anschließend erfolgte das Lösen des Kristallvioletts in 200µl 33%iger Essigsäure pro Loch und die Bestimmung der optischen Dichte bei einer

Wellenlänge von 570nm in einem Photometer (Tecan Reader Sunrise, Tecan Austria Gesellschaft).

c) Bestimmung der Apoptoserate Ad5-infizierter Zellen

Zunächst wurden in 6-Loch-Platten pro Loch  $2 \times 10^5$  H1299-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen eines Lochs ausgezählt und die Zellen mit einer MOI 100 mit den angegebenen Adenoviren infiziert. Die Infektion wurde, wie in 3.2.4.1 beschrieben, durchgeführt. Nach 24h wurden die Zellen entweder mit 12,5µg/ml CHX oder mit 100ng/ml TNF oder mit 12,5µg/ml CHX und 100ng/ml TNF oder mit Medium behandelt. 24h später wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und das Medium mit den abgelösten Zellen 5min bei 500 x g abzentrifugiert. Danach wurden der Überstand verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Annexin-V-Alexa 568 (Roche Diagnostics) oder mit Annexin-V-FITC (Roche Diagnostics) und 100ng/ml Propidium-Iodid (Sigma-Aldrich) nach Anleitung des Herstellers gefärbt. Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Bestimmung der Fluoreszenz.

### 3.2.11 Nachweis der E3-14.7K-Expression

a) Nachweis der E3-14.7K-Expression aus E3-14.7K-Zellen

$3 \times 10^6$  E3-14.7K-transduzierte H1299-Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 800µl Lysepuffer (1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0,1% SDS, 1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1mM  $\text{Na}_2\text{EGTA}$ , 20 mM NaF) und Proteaseinhibitoren (Roche Complete, Roche Diagnostics) überschichtet. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Schale abgelöst und im Lysepuffer 30min bei 4°C geschüttelt. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und auf Anwesenheit von E3-14.7K durch Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (3.2.12) und *Western Blotting* (3.2.13) geprüft.

b) Nachweis der E3-14.7K-Expression aus Ad5-Zellen

$3 \times 10^6$  H1299-Zellen wurden in 10cm-Schalen mit Ad5 mit einer MOI 100, wie in 3.2.4.1 beschrieben, infiziert. Wie in a) beschrieben, wurden 24h nach

Infektion die Zellen lysiert und die Expression von E3-14.7K mittels *Western Blotting* nachgewiesen.

### 3.2.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden 5%ige Trenn- und 12,5%ige Sammelgele in Mini Protean 3 Gelelektrophorese Apparaturen (Bio-rad) eingesetzt. Der Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben wurde mit Hilfe des D<sub>c</sub> Protein Assay (Bio-Rad) nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Vor der Beladung des Gels wurden die Proteinproben mit 2 x Probenpuffer (50mM Tris, 1,2% SDS, 30% Glycin, 0,005% Bromphenolblau, 6,6%  $\beta$ -Mercaptoethanol) im Verhältnis 2:1 gemischt, 5min im Wasserbad gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese fand unter Verwendung eines Laufpuffers (25mM Tris-HCl, 192mM Glycin, 0,1% SDS) bei 25mA statt.

### 3.2.13 Proteinnachweis

Die Übertragung der Proteine von Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen (Protran Nitrozellulosemembran, Schleicher & Schuell) fand mittels *Semi-Dry Blotting* unter Verwendung einer Blot-Apparatur (Biometra) und eines Blottingpuffers (25mM Tris, 150mM Glycin, 10% Ethanol, pH 8,3) nach Anleitung des Herstellers statt. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend 1h bei Raumtemperatur in TBST (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH7,5) mit 5% Milchpulver geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in TBST mit 1% Milchpulver bei 4°C über Nacht. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend dreimal mit TBST gewaschen und nachfolgend 1h bei Raumtemperatur mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in TBST und 1% Milchpulver inkubiert. Nachdem die Nitrozellulose dreimal mit TBST gewaschen worden war, wurde sie mit ECL-Lösung (ECL NOWA-Reagentien, MoBiTec) versetzt und die entstehende Lumineszenz mit einem Röntgenfilm (Hyperesa Hyperfime, Amersham Biosciences) detektiert.



### **3.2.14 Bestimmung der N-SMase-Aktivität**

Die Bestimmung der N-SMase-Aktivität wurde von Supandi Winito-Morbach durchgeführt. Dabei wurden die Zellen nach der angegebenen Zeit mit 100ng/ml TNF stimuliert und anschließend in 20mM HEPES, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT und 0,2% NP-40 bei pH 7,4 unter Zusatz von Proteaseinhibitoren (Roche Complete, Roche Diagnostics) homogenisiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand mit N-methyl-[C<sup>14</sup>] Sphingomyelin in einer Lösung aus 20mM HEPES und 1mg MgCl<sub>2</sub> bei pH 7,4 und 37°C inkubiert. Die Substratumsetzung wurde nach Extraktion des Phosphorylcholins mittels eines Gemisches aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 in einem  $\beta$ -Counter gemessen. Für jeden Zeitpunkt wurde der Median aus fünf unabhängigen Experimenten in % der Kontrolle berechnet. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen.

## 4 Ergebnisse

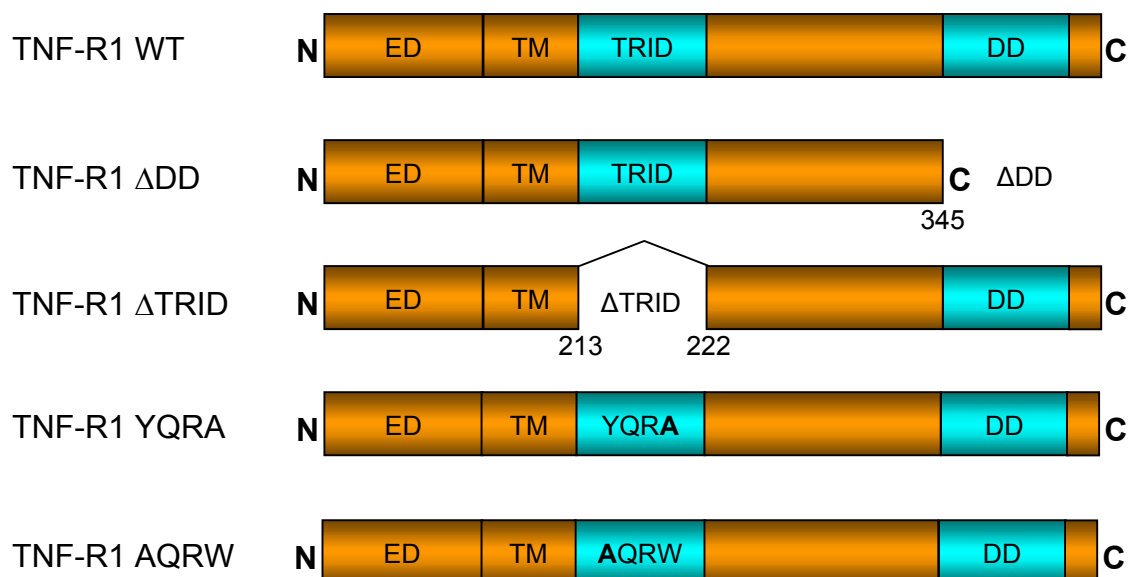
### 4.1 Die Funktion der TNF-R1-Internalisierung

#### 4.1.1 Vorarbeiten

TNF ist ein immunregulatorisches Zytokin, das *in vivo* vielfältige Funktionen erfüllt. Diese reichen von der Differenzierung und Proliferation der Zelle bis zum Auslösen von Apoptose. TNF bindet an zwei zellmembranständige Rezeptoren, den TNF-R1 und TNF-R2. Die Bindung von TNF an den TNF-R1 führt zur Rekrutierung des Proteins TRADD an einen bestimmten Bereich im zytoplasmatischen Teil des TNF-R1, die Todesdomäne (DD) (Hsu *et al.*, 1995). TRADD fungiert als Plattform zur Rekrutierung weiterer Proteine. Eine Interaktion von TRADD mit RIP-1 und TRAF-2 hat eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und damit die Expression von antiapoptotischen Proteinen zur Folge (Hsu *et al.*, 1996a). Alternativ kann an TRADD aber auch FADD und an dieses Caspase-8 rekrutiert werden. Der Proteinkomplex aus TRADD, FADD und Caspase-8 wird als *death inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet, da seine Bildung zur Induktion von Apoptose führt (Boldin *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1996c). Bislang sind die molekularen Mechanismen, die eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung oder Apoptose nach TNF-Stimulation bedingen, noch nicht vollständig verstanden.

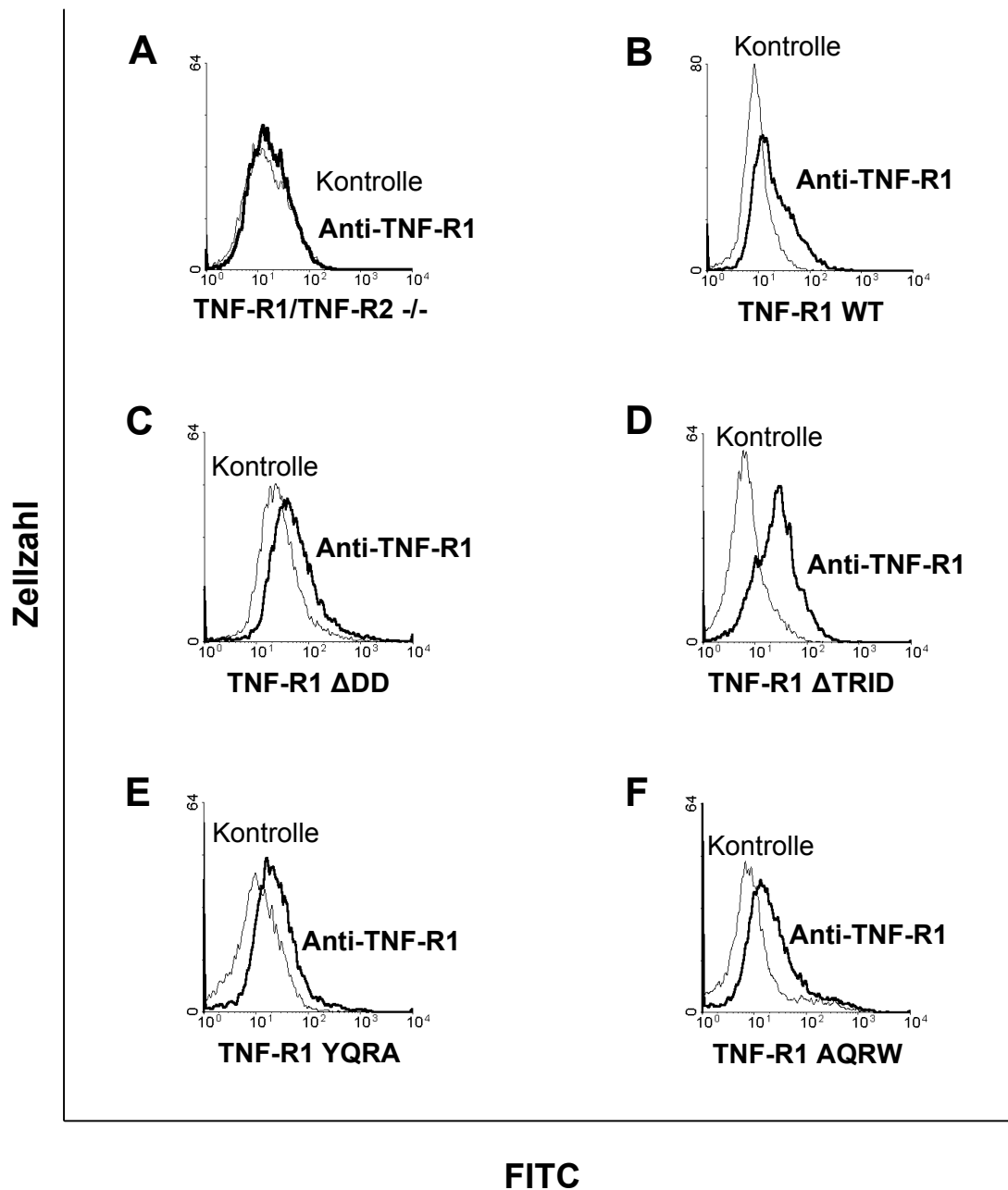
Experimente mit U937-Zellen konnten eine Abhängigkeit der TNF-vermittelten Apoptose von der Internalisierung des TNF-R1 zeigen (Schütze *et al.*, 1999). Wurden die Zellen mit Monodansylcadaverin behandelt oder wurde eine K<sup>+</sup>-Depletion durchgeführt, war eine Internalisierung des TNF-R1 nach Stimulation mit TNF nicht mehr möglich. Zugleich konnte in diesen Zellen mit TNF keine Apoptose mehr ausgelöst werden. In weiterführenden Versuchen in unserer Arbeitsgruppe konnte eine zehn Aminosäuren umfassende Region im zytoplasmatischen Teil des TNF-R1 gefunden werden, deren Deletion die

Um feststellen zu können, ob die Aminosäuresequenz YQRW für die TNF-R1-Internalisierung notwendig ist, wurden durch *in-vitro*-Mutagenese von TRID Tryptophan (TNF-R1 YQRA) oder Tyrosin (TNF-R1 AQRW) gegen Alanin ausgetauscht. Als Kontrollen wurden der Wildtyp-TNF-R1 (TNF-R1 WT), ein TNF-R1 ohne TRID (TNF-R1  $\Delta$ TRID) und ein TNF-R1 ohne Todesdomäne (TNF-R1  $\Delta$ DD) verwendet (Abb. 4).



Im TNF-R1 WT folgen ausgehend vom N-Terminus (N) die extrazellulären Domänen (ED), die Transmembrandomäne (TM), die daran direkt anschließende Internalisierungsdomäne (TRID) und schließlich die am C-Terminus (C) gelegene Todesdomäne (DD). Angegeben in Zahlen sind die Aminosäuren, die jeweils deletiert wurden. Bei den beiden Punktmutanten ist der Austausch von Tryptophan bzw. Tyrosin gegen Alanin hervorgehoben.

Nach Herstellung der TNF-R1-Konstrukte folgte die von Zellen, welche jeweils nur eines der Konstrukte exprimieren sollten. Dazu wurde in immortalisierte Fibroblasten aus Oberschenkelknochen TNF-R1/TNF-R2-defizienter Mäuse die cDNA der TNF-R1-Konstrukte zusammen mit einem Puromycinresistenzmarker durch retroviralen Gentransfer eingebracht. Diese Methode hat gegenüber einer transienten Transfektion den Vorteil, dass das eingebrachte Gen stabil ins Genom der Zelle integriert wird (Naviaux und Verma, 1992). Nach der Transduktion wurden die Zellen mit Puromycin behandelt, um Zellpopulationen zu erhalten, in denen alle Zellen das jeweilige TNF-R1-Konstrukt exprimieren sollten. Die Behandlung mit Puromycin wurde beendet, wenn alle nicht transduzierten Zellen eines parallel geführten Ansatzes abgestorben waren. Anschließend wurde mit Hilfe eines TNF-R1-spezifischen Antikörpers die Expression des jeweiligen TNF-R1-Konstrukts durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb. 5).



**Abb. 5 Zelloberflächenexpression der verschiedenen TNF-R1-Konstrukte**

Zellen, die eines der angegebenen TNF-R1-Konstrukte exprimierten, wurden mit einem TNF-R1-spezifischen FITC-gekoppelten Antikörper gefärbt. Als Kontrolle wurden ungefärbte Zellen eingesetzt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse fünf voneinander unabhängiger Messungen. Zellen mit einem rekonstituierten TNF-R1 zeigten nach Antikörperbehandlung gegenüber der Kontrolle eine Zunahme der Fluoreszenz (B-F), TNF-R1/TNF-R2-defiziente Zellen hingegen nicht (A).

Alle Zellpopulationen, die retroviral mit einem TNF-R1-Konstrukt transduziert worden waren, wiesen einen Anstieg in der Fluoreszenz nach Färbung mit einem TNF-R1-spezifischen Antikörper auf (Abb. 5, B-F). Dagegen war bei TNF-R1/TNF-R2-defizienten Zellen keine Veränderung der Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 5A). Somit bestätigte dieses Experiment, dass die TNF-R1/TNF-R2-defizienten Zellen nach retroviralem Gentransfer die verschiedenen TNF-R1-Konstrukte auf ihrer Oberfläche exprimierten.

#### **4.1.3 Die Bedeutung des Aminosäuremotivs YQRW für die Internalisierung des TNF-R1**

Zur Überprüfung der Hypothese, dass es sich bei der Aminosäuresequenz YQRW um das für die TNF-R1-Internalisierung notwendige Motiv handelt, wurde die Internalisierung des TNF-R1 in TNF-R1 WT-, TNF-R1  $\Delta$ DD-, TNF-R1  $\Delta$ TRID- und TNF-R1 YQRA-Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst mit biotinyliertem TNF und daran gebundenem Avidin-FITC bei 4°C markiert. Durch eine anschließende Temperaturerhöhung auf 37°C sollten internalisierungsfähige TNF-Rezeptoren synchron in die Zelle aufgenommen werden, während internalisierungsdefiziente TNF-R1-Konstrukte weiterhin zellmembranständig bleiben sollten (Abb. 6).

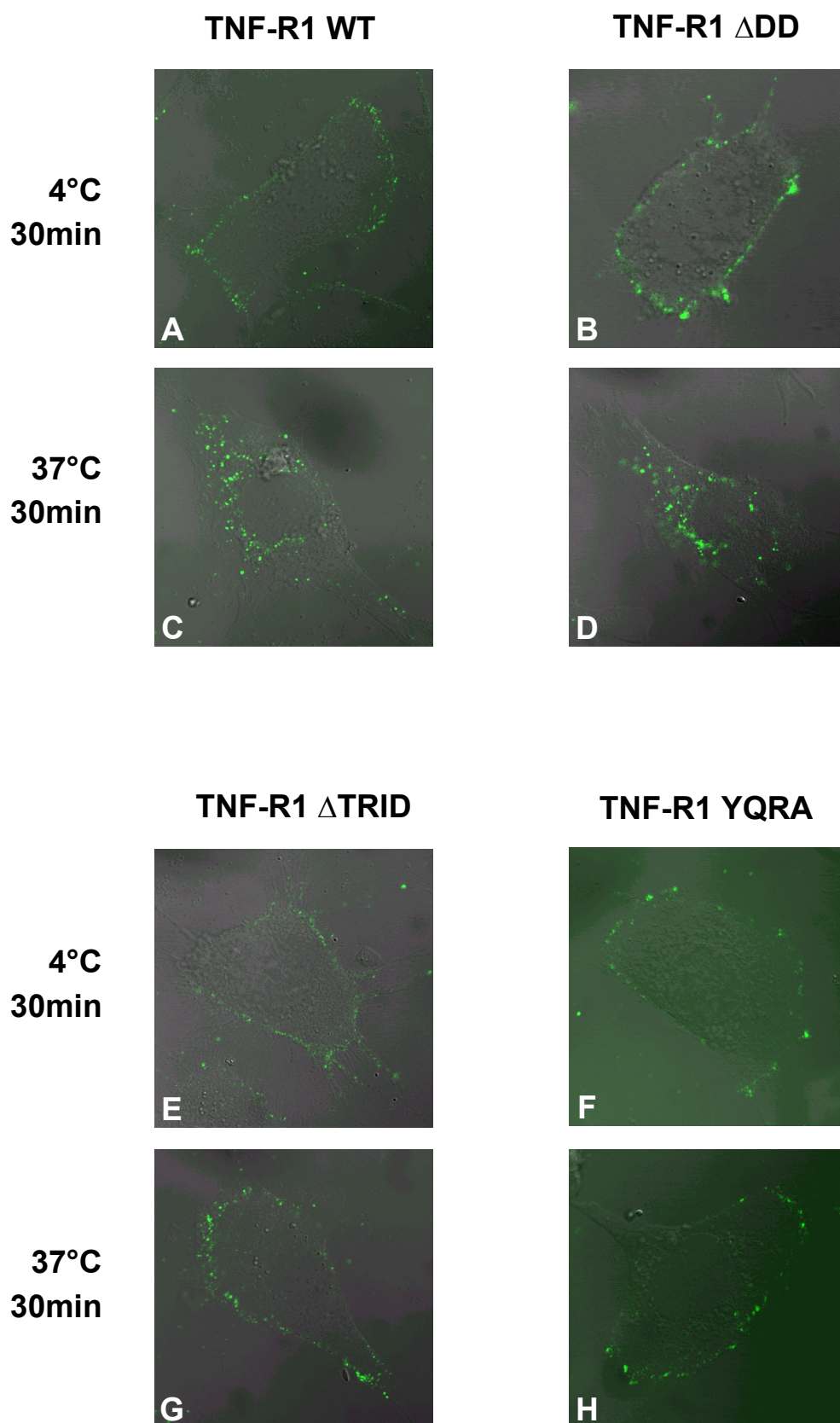


Abb. 6

**Abb. 6 Bestimmung der Internalisierung von TNF-R1-Konstrukten**

Zellen, die das angegebene TNF-R1-Konstrukt exprimierten, wurden bei 4°C 1h mit Biotin-TNF/Avidin-FITC inkubiert. Anschließend erfolgte in einem Ansatz eine 30minütige Inkubation bei 37°C, während als Kontrolle ein zweiter Ansatz für diese Zeit bei 4°C verblieb. Die Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten. Während nach Inkubation bei 4°C alle TNF-Rezeptoren zellmembranständig waren (A,B,E und F), internalisierten nach der Temperaturerhöhung auf 37°C nur TNF-Rezeptoren mit dem unveränderten Internalisierungsmotiv (C und D). Sowohl eine Deletion der TNF-R1-Internalisierungsdomäne (G) als auch ein Austausch von Tryptophan gegen Alanin innerhalb der Aminosäuresequenz YQRW (H) führten zu einer vollständigen Blockierung der TNF-R1-Internalisierung.

Während nach Inkubation bei 4°C alle TNF-Rezeptoren zellmembranständig waren (Abb. 6, A,B,E und F), internalisierten nach der Temperaturerhöhung auf 37°C nur TNF-Rezeptoren mit dem unveränderten Internalisierungsmotiv YQRW (TNF-R1 WT und TNF-R1  $\Delta$ DD) (Abb. 6, C und D). Deutlich war in den betreffenden Zellen eine intrazelluläre Akkumulation TNF-R1-positiver Vesikel zu beobachten. Diese Vesikel waren dabei nicht diffus im Zytosol verteilt, sondern konzentrierten sich im perinukleären Raum. Ein völlig anderes Bild ergab sich dagegen bei TNF-R1  $\Delta$ TRID-Zellen. Hier führte die Deletion von TRID zu einer vollständigen Blockierung der TNF-R1-Internalisierung (Abb. 6G). Der TNF-R1 verblieb auch nach einer Stunde ausschließlich an der Zellmembran, intrazellulär konnten keine TNF-R1-positiven Vesikel beobachtet werden. Eine vollständige Internalisierungsblockierung wurde ebenfalls beobachtet, wenn nicht die gesamte TRID entfernt wurde, sondern lediglich Tryptophan innerhalb des Internalisierungsmotivs gegen Alanin ausgetauscht wurde (TNF-R1 YQRA) (Abb. 6H).

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Internalisierung des TNF-R1 durch das in der TRID gelegene kanonische Internalisierungsmotiv YXX $\Phi$  vermittelt wird. Außer YQRW besitzt der TNF-R1 keine weitere Aminosäuresequenz, die eine Internalisierung ermöglicht.

**4.1.4 Einfluss der TNF-R1-Internalisierung auf die DISC-Rekrutierung**

Der TNF-R1 besitzt im Gegensatz zu vielen anderen Zellrezeptoren keinerlei katalytische Aktivität (Wajant *et al.*, 2003). Zur intrazellulären Weitergabe apoptotischer Signale wird an die Todesdomäne ein Proteinkomplex (DISC) aus



TRADD, FADD und Caspase-8 rekrutiert. Die Eigenschaft, Apoptose über den DISC auszulösen, teilt der TNF-R1 mit anderen Todesrezeptoren, wie z.B. Fas, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Aggarwal, 2003). Im Gegensatz zu diesen Rezeptoren war es aber beim TNF-R1 bisher nicht möglich, die Bestandteile des DISC mittels Immunpräzipitation unter physiologischen Bedingungen darzustellen (Harper *et al.*, 2003; Micheau und Tschopp, 2003). Nachgewiesen werden konnte lediglich unter *in-vitro*-Bedingungen die Bindung von TRADD an den TNF-R1 (Hsu *et al.*, 1995) und die von FADD und Caspase-8 an TRADD (Boldin *et al.*, 1996). RIP-1 und TRAF-2 dagegen lassen sich mit dem TNF-R1 koimmunpräzipitieren (Micheau und Tschopp, 2003). Diese Beobachtungen führten zu den Vermutungen, dass der DISC im Fall des TNF-R1 entweder vergleichsweise instabil ist oder zur Rekrutierung bestimmte, noch nicht bekannte Bedingungen benötigt (Wajant *et al.*, 2003) oder gar, dass der DISC überhaupt nicht gebildet wird (Micheau und Tschopp, 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte ein neuer methodischer Ansatz gewählt werden, um die Rekrutierung des DISC an den TNF-R1 belegen zu können. Dazu sollten die Vesikel, in denen der TNF-R1 nach Stimulation mit TNF internalisiert wird, isoliert und die Anwesenheit der DISC-Proteine nachgewiesen werden. Die Isolierung der Vesikel sollte mit Hilfe einer eigens hierfür entwickelten *Free-Flow*-Magnetkammer erfolgen, einer Apparatur, welche die Aufreinigung immunomagnetisch markierter Zellkompartimente ermöglicht (Tchikov *et al.*, 2001). Ausgehend von den Befunden von Schütze *et al.*, die eine Abhängigkeit der Apoptoseinduktion von der TNF-R1-Internalisierung zeigen konnten (Schütze *et al.*, 1999), sollte anschließend untersucht werden, ob eine Blockierung der TNF-R1-Internalisierung durch Deletion oder Mutation der Aminosäuresequenz YQRW zu einem Ausbleiben der DISC-Rekrutierung führt.

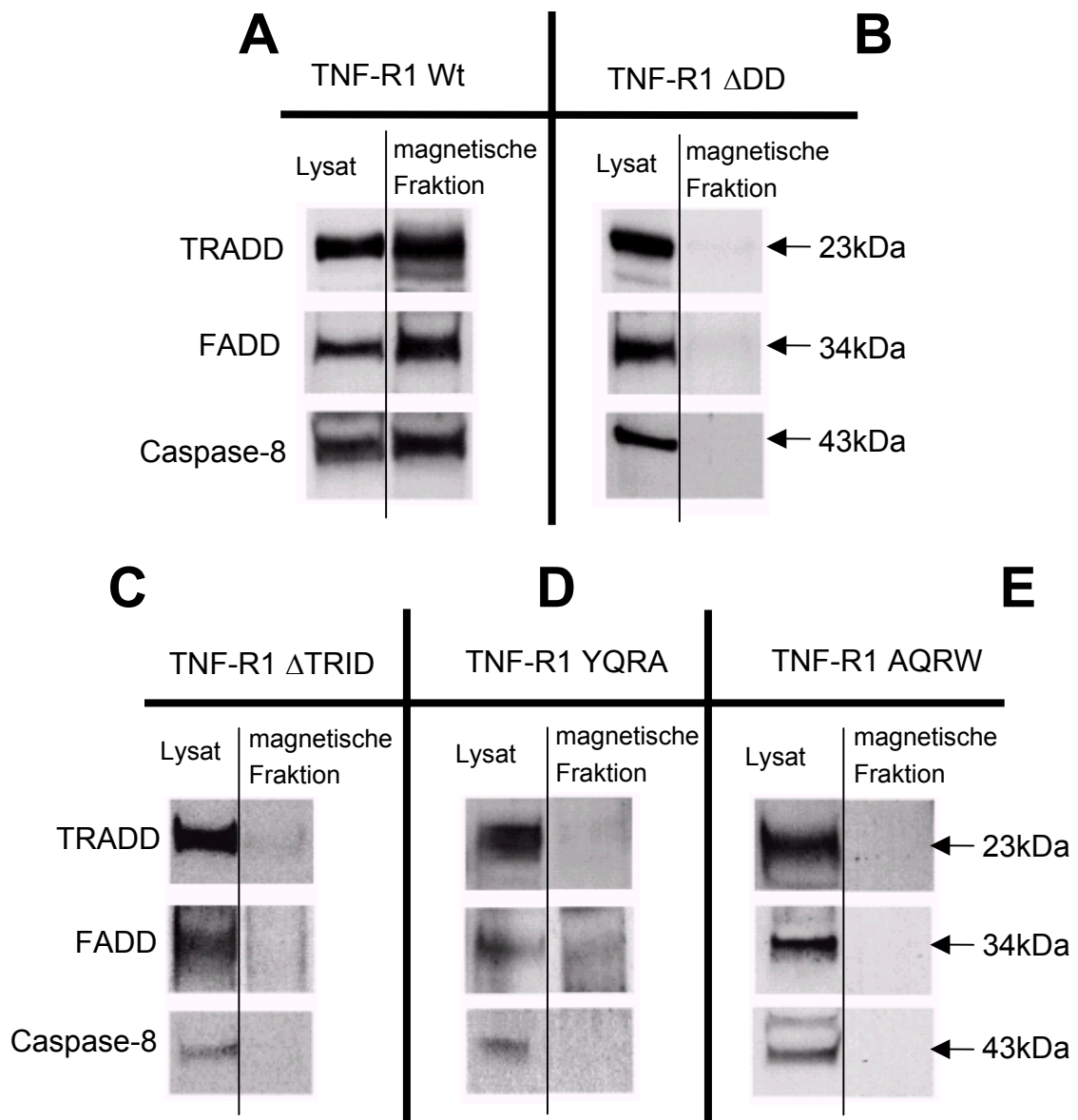
TNF-R1 WT-Zellen wurden mit metallpartikelmarkiertem TNF zunächst bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur für 30min auf 37°C erhöht, um die Internalisierung des TNF-R1 zu ermöglichen. Die nachfolgende Homogenisierung der Zellen erfolgte mechanisch unter milden Pufferbedingungen ohne Einsatz eines Detergenz. Dieses Vorgehen sollte eine Zerstörung der Vesikel vermeiden. Nach der anschließenden Isolierung der magnetischen

TNF-R1-haltigen Fraktion erfolgte ein Nachweis der DISC-Proteine mittels SDS-PAGE und *Western Blotting* (Abb. 7A). Als Negativkontrolle wurde parallel ein Ansatz mit TNF-R1  $\Delta$ DD-Zellen durchgeführt (Abb. 7B).

Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C ließen sich in den magnetisch isolierten Fraktionen aus TNF-R1 WT-Zellen sowohl TRADD als auch FADD und Caspase-8 nachweisen. Somit konnte durch dieses Experiment die Rekrutierung des DISC an den TNF-R1 zum ersten Mal unter physiologischen Bedingungen gezeigt werden. Beachtenswert ist besonders, dass in den isolierten Fraktionen die aus der 55kDa-Proform prozessierte 42kDa-Form der Caspase-8 gefunden werden konnte. Dies belegt, dass der Rezeptorkomplex zum Zeitpunkt der Isolierung aktiviert war. Die Analyse der magnetischen Fraktionen aus TNF-R1  $\Delta$ DD-Zellen zeigte erwartungsgemäß, dass eine Deletion der DD zum Ausbleiben der DISC-Rekrutierung führt.

Um zu überprüfen, ob eine Blockierung der TNF-R1-Internalisierung Auswirkungen auf die Rekrutierung des DISC hat, wurden nun die magnetischen Fraktionen aus Zellen analysiert, deren TNF-R1 das Internalisierungsmotiv entweder gar nicht (TNF-R1  $\Delta$ TRID) oder nur mutiert (TNF-R1 YQRA) besaß. Als zusätzliche Mutante wurde ein TNF-R1-Konstrukt eingesetzt, in dessen Internalisierungsmotiv Tyrosin gegen Alanin ausgetauscht worden war (TNF-R1 AQRW). In keiner der magnetisch isolierten Fraktionen aus diesen Zellen konnten die Komponenten des DISC nachgewiesen werden, obwohl der DISC physikalisch aufgrund der intakten DD an den jeweiligen TNF-R1 binden könnte (Abb. 7, C-E).

Somit konnten in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal unter physiologischen Bedingungen sowohl die DISC-Rekrutierung an den TNF-R1 als auch die Notwendigkeit der TNF-R1-Internalisierung für die DISC-Rekrutierung gezeigt werden. Eine Blockierung der TNF-R1-Internalisierung durch Deletion des Internalisierungsmotivs oder Austausch von Tryptophan gegen Alanin (vgl. 4.1.3) führte zwangsläufig zum Ausbleiben des DISC. Dass dies auch nach Austausch von Tyrosin gegen Alanin beobachtbar war, unterstreicht die Notwendigkeit eines intakten Internalisierungsmotivs für die DISC-Rekrutierung.



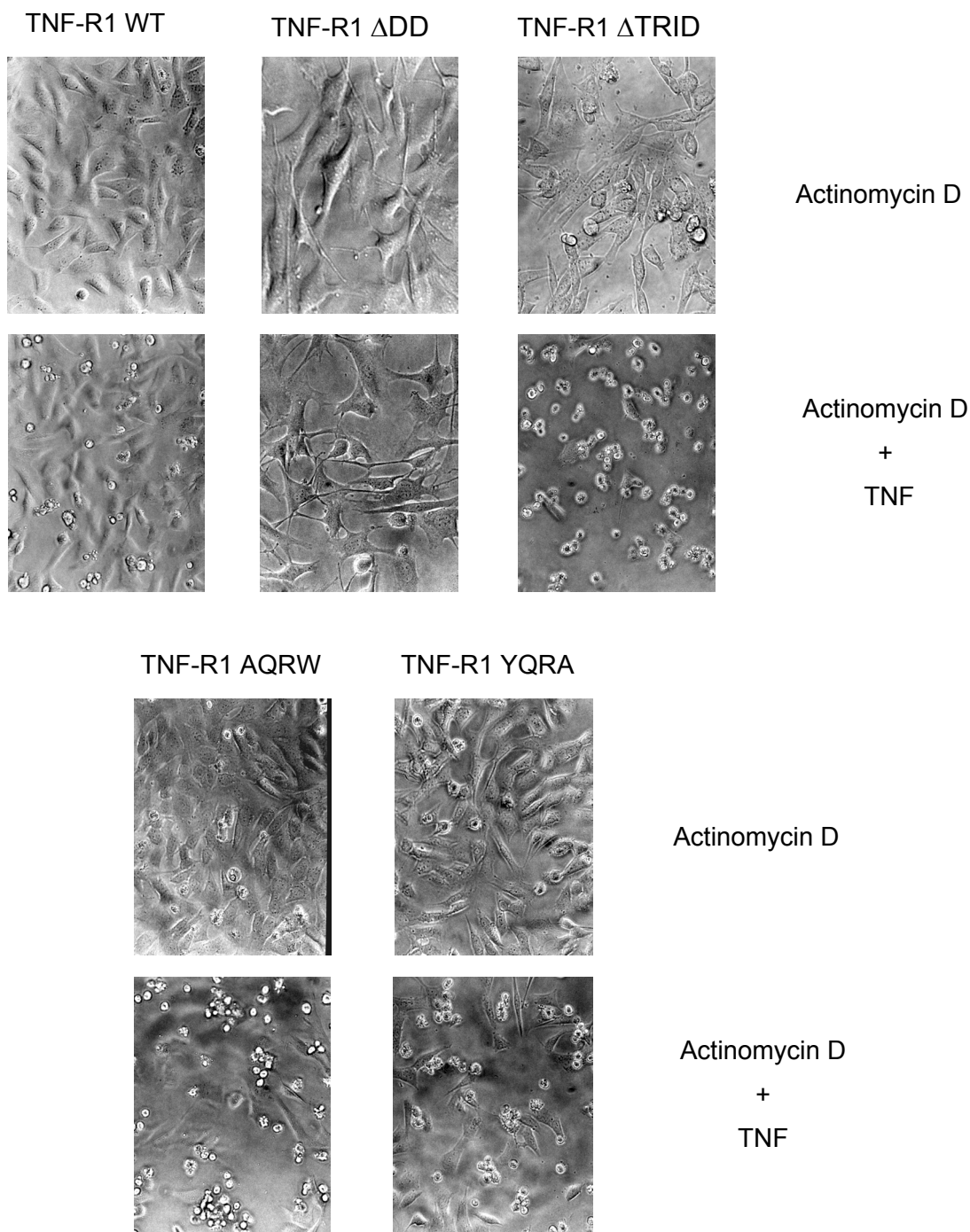
**Abb. 7 DISC-Rekrutierung an verschiedene TNF-R1-Konstrukte**

Zellen, die den angegebenen TNF-R1 exprimierten, wurden nach 30minütiger Stimulation mit immunomagnetisch markiertem TNF schonend homogenisiert, und die magnetischen Fraktionen mit Hilfe einer *Free-Flow-Magnetkammer* isoliert. Jeweils gleiche Mengen der einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Anwesenheit von TRADD, FADD und Caspase-8 durch *Western Blotting* geprüft. Als Expressionskontrolle wurde Lysat aus TNF-R1/TNF-R2-defizienten Zellen aufgetragen. Nach Stimulation mit TNF wurde der DISC aus TRADD, FADD und Caspase-8 an die DD des TNF-R1 rekrutiert (A). Eine Deletion der Todesdomäne (B) verhinderte die DISC-Rekrutierung. Ebenso führte eine Deletion der Internalisierungsdomäne (C) oder eine Mutation innerhalb des Internalisierungsmotivs (D und E) zum Ausbleiben der DISC-Rekrutierung.

#### **4.1.5 Einfluss der TNF-R1-Internalisierung auf die TNF-induzierte Apoptose**

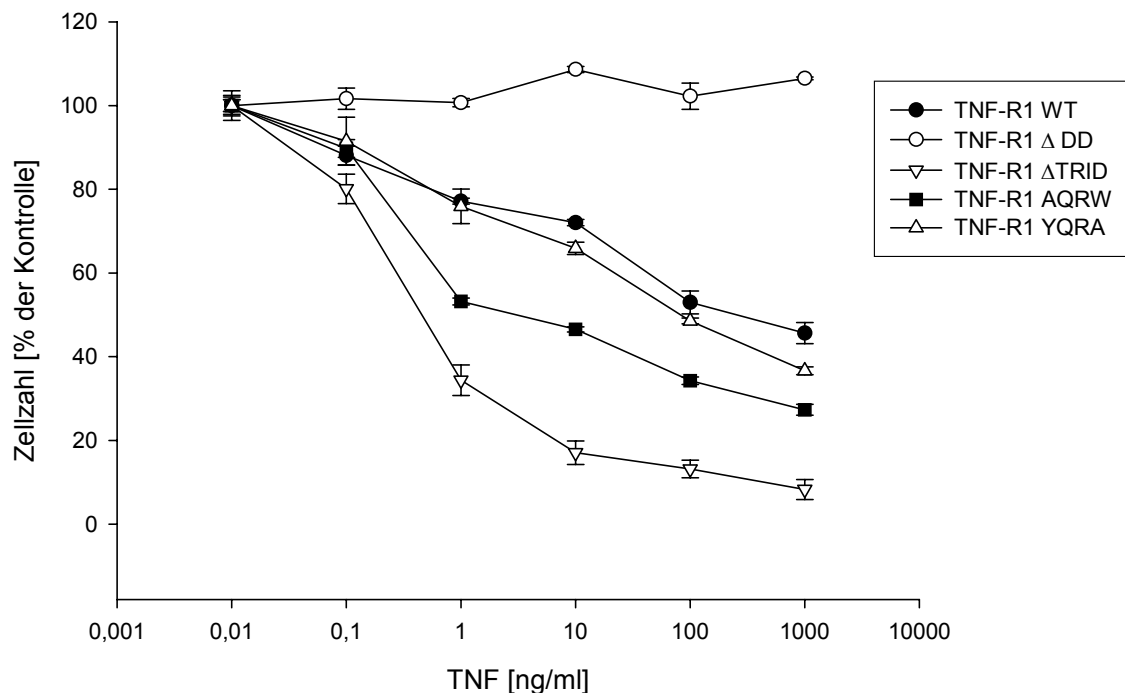
##### **4.1.5.1 Bestimmung der TNF-Zytotoxizität in TNF-R1-internalisierungs-defizienten Zellen**

Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass die Internalisierung des TNF-R1 eine unabdingbare Voraussetzung für die Rekrutierung des DISC darstellt. Im Folgenden sollte geprüft werden, ob eine Blockierung der TNF-R1-Internalisierung und damit die Verhinderung der DISC-Rekrutierung Zellen vor TNF-induzierter Apoptose schützt. Daher wurde die TNF-Zytotoxizität in allen in 4.1.2 hergestellten Zellen zunächst anhand morphologischer Veränderungen bestimmt. Anschließend erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung eine Messung der Zytotoxizität in Abhängigkeit der TNF-Konzentration. In beiden Experimenten wurden die Zellen vor Stimulation mit TNF mit dem Proteinsynthesehemmer Actinomycin D behandelt. Dies war notwendig, da ohne Inhibition der Proteinsynthese nach Stimulation mit TNF die meisten Zellen nicht apoptotisch reagieren, sondern aufgrund einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B zahlreiche antiapoptotische Proteine synthetisieren (Karin und Lin, 2002; Wanebo, 1989; Fas *et al.*, 2006). Aufgrund der Hemmung der Proteinbiosynthese kann Actinomycin D aber selbst toxisch wirken. Darum wurden in einem weiteren Ansatz Zellen mit Actinomycin D allein behandelt, um die Zytotoxizität von Actinomycin D bestimmen zu können. In Abb. 8 sind durchlichtmikroskopische Aufnahmen der jeweiligen Zellen nach Behandlung mit TNF zu sehen, Abb. 9 zeigt das Ergebnis der Zytotoxizitätsbestimmung mittels Kristallviolett-Färbung.



**Abb. 8 Morphologische Bestimmung der TNF-Zytotoxizität**

Die Abbildung zeigt repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen, die verschiedene TNF-R1-Konstrukte exprimierten, nach Stimulation mit TNF. Die Zellen wurden 2h mit 2µg/ml Actinomycin D und anschließend 4h mit 100ng/ml TNF inkubiert. Deutlich ist die zytotoxische Wirkung von TNF auf Zellen zu erkennen, deren TNF-R1 entweder kein oder ein mutiertes Internalisierungsmotiv besaß. Im Vergleich dazu reagierten TNF-R1 WT-Zellen weniger toxisch auf TNF, TNF-R1  $\Delta$ DD-Zellen waren erwartungsgemäß TNF-resistent.



**Abb. 9 Konzentrationsabhängige Toxizität von TNF in Zellen mit verschiedenen TNF-Rezeptoren**

Zellen mit dem angegebenen TNF-R1 wurden mit 2 µg/ml Actinomycin D für 2h vorinkubiert und anschließend 4h mit der angegebenen Menge TNF stimuliert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus Triplikaten. Zellen, deren TNF-R1 entweder gar kein oder nur ein mutiertes Internalisierungsmotiv besaß, waren gegenüber TNF-R1 WT-Zellen hypersensitiv. TNF-R1 ΔDD-Zellen erwiesen sich als TNF-resistent.

Bei ungefähr 20% der TNF-R1 WT-Zellen trat ein zytotoxischer Effekt bereits bei 1,0ng/ml TNF ein. Dieser verstärkte sich bei steigenden TNF-Mengen, bei Zugabe von 1000ng/ml TNF war bereits die Hälfte der Zellen tot. Entsprechend zeigten die lichtmikroskopischen Aufnahmen bei Zugabe von 100ng/ml TNF viele Zellen, die granulär erschienen, abgekugelt waren und aufschwammen. Teile des Zellrasens waren noch intakt. Dem gegenüber war bei TNF-R1 ΔDD-Zellen keine Apoptose nach Behandlung mit 100ng/ml TNF zu erkennen, die Zellen blieben adhärent, der Zellrasen erschien unverändert. Ebenso konnte bei keiner TNF-Konzentration eine Abnahme der Zellzahl festgestellt werden. TNF-R1 ΔTRID-, TNF-R1 YQRA- und TNF-R1 AQRW-Zellen hingegen zeigten eine höhere TNF-Sensitivität als TNF-R1 WT-Zellen. Dies traf vor allem auf TNF-R1 ΔTRID-Zellen zu. Hier waren bereits bei 1,0ng/ml TNF mehr als 60%

der Zellen tot, bei 1000ng/ml ungefähr 90%. Entsprechend war kein Zellrasen mehr zu erkennen, fast alle Zellen waren granulär, abgekugelt und schwammen auf. TNF-R1 YQRA- und TNF-R1 AQRW-Zellen reagierten ebenfalls sensibler auf TNF als TNF-R1 WT-Zellen, der Effekt war aber nicht so deutlich ausgeprägt wie bei TNF-R1  $\Delta$ TRID-Zellen. Bei 1,0ng/ml TNF reagierten 20% und bei 1000ng/ml 60% der TNF-R1 YQRA-Zellen apoptotisch. TNF-R1 AQRW-Zellen waren mit einer Apoptoserate von 50% bei 1,0ng/ml und 70% bei 1000ng/ml sensitiver als TNF-R1 YQRA-Zellen.

TNF hatte somit trotz eines deletierten oder mutierten TNF-R1-Internalisierungsmotivs auf TNF-R1  $\Delta$ TRID-, TNF-R1 YQRA- und TNF-R1 AQRW-Zellen eine stark zytotoxische Wirkung. Der Zelltod musste in diesen Zellen DISC-unabhängig induziert worden sein, da der DISC an internalisierungsdefizienten TNF-Rezeptoren nicht gebildet wird (vgl. 4.1.4). Außer TRADD kennt man noch andere Adapterproteine, die nach Stimulation mit TNF an den TNF-R1 rekrutiert werden und verschiedene Signalkaskaden auslösen. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, welcher der möglichen TNF-R1-Signalwege für die TNF-Sensitivität von Zellen mit internalisierungsdefizienten TNF-Rezeptoren verantwortlich sein könnte.

#### 4.1.6 Untersuchungen an TNF-R1 $\Delta$ TRID $\Delta$ NSD-Zellen

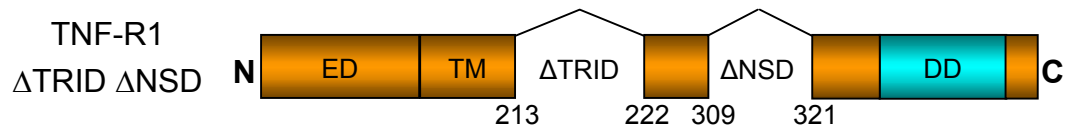
Neben TRADD ist FAN (*factor associated with N-SMase*) ein weiteres Protein, das nach TNF-Stimulation an den TNF-R1 bindet (Adam-Klages *et al.*, 1996). FAN wird an einen Bereich des TNF-R1 rekrutiert, der N-terminal der Todesdomäne liegt und die Bezeichnung NSD (*neutral sphingomyelinase domain*) trägt. Nach Bindung an den TNF-R1 aktiviert FAN die zellmembranständige Neutrale Sphingomyelinase (N-SMase), die Sphingomyelin zu Phosphorylcholin und Ceramid hydrolysiert (Adam-Klages *et al.*, 1996). Ceramide sind als potente proapoptotische Faktoren beschrieben (Jarvis *et al.*, 1994). Es schien daher am wahrscheinlichsten, dass die TNF-R1  $\Delta$ TRID-, TNF-R1 YQRA- und TNF-R1 AQRW-Zellen aufgrund einer starken Aktivierung der N-SMase apoptotisch auf TNF reagiert haben könnten. Um dies zu prüfen, wurde analog zu 4.1.2 durch *in-vitro*-Mutagenese ein weiteres TNF-R1-

Konstrukt hergestellt, dem sowohl die TRID als auch die NSD fehlte (TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD) (Abb. 10A). Anschließend wurde das Konstrukt in TNF-R1/TNF-R2-defizienten Zellen stabil exprimiert (Abb. 10B) und seine Internalisierungsdefizienz geprüft (Abb. 10C). Danach wurde die TNF-Sensitivität von Zellen mit TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD untersucht (Abb. 11).

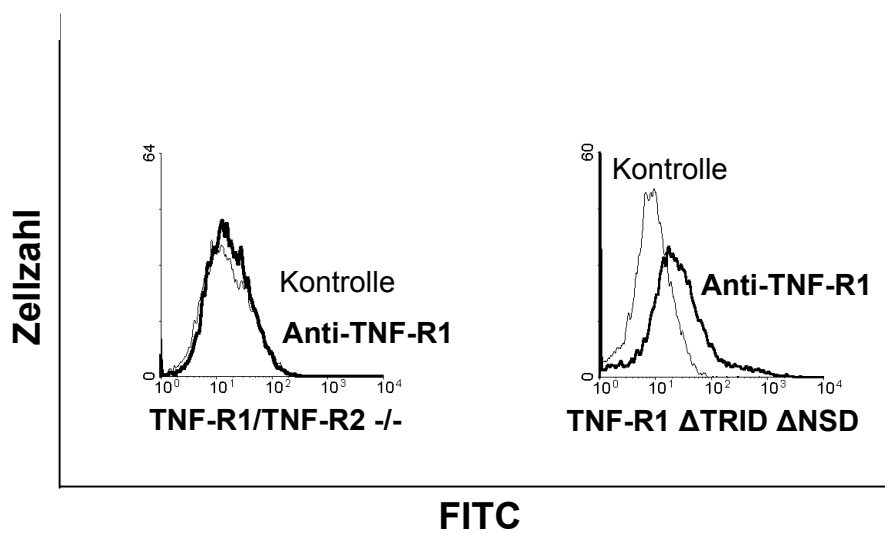
Nach Stimulation mit TNF verblieb der TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD vollständig an der Zellmembran. Darüber hinaus waren TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen resistent gegenüber TNF und verhielten sich damit exakt wie TNF-R1  $\Delta$ DD-Zellen, obwohl der TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD noch über eine Todesdomäne verfügte. Die Experimente mit TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen wiesen somit darauf hin, dass der in 4.1.5 beobachtete DISC-unabhängige Zelltod auf eine stark erhöhte Aktivierung der N-SMase als Folge der TNF-R1-Internalisierungsdefizienz zurückzuführen sein könnte. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde im Folgenden die Aktivität der N-SMase in Zellen mit internalisierungsdefizienten TNF-Rezeptoren bestimmt.



**A**



**B**



**C**

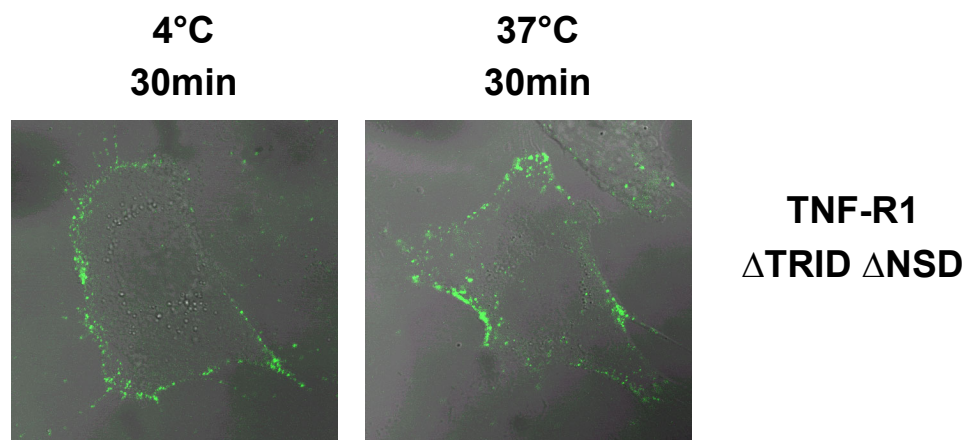


Abb. 10

**Abb. 10 Bestimmung der Zelloberflächenexpression und Internalisierung des TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD**

(A) Schematische Darstellung des TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Konstrukts

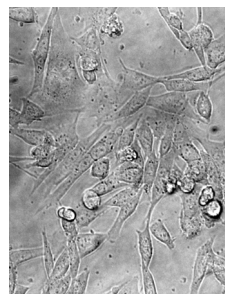
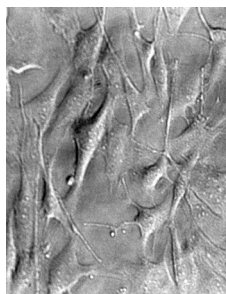
Angegeben in Zahlen sind die Aminosäuren, die jeweils deletiert wurden. N: N-Terminus; ED: extrazelluläre Domänen; TM: Transmembrandomäne; NSD: *neutral sphingomyelinase domain*; TRID: *TNF-R1 internalization domain*; DD: *death domain*; C: C-Terminus

(B) Zelloberflächenexpression des TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD

TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen und TNF-R1/TNF-R2-defiziente Zellen wurden mit einem TNF-R1-spezifischen FITC-gekoppelten Antikörper gefärbt. Als Kontrolle wurden ungefärbte Zellen eingesetzt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse fünf voneinander unabhängiger Messungen. Zellen mit einem rekonstituierten TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD zeigten nach Antikörperbehandlung gegenüber der Kontrolle eine Zunahme der Fluoreszenz, TNF-R1/TNF-R2-defiziente Zellen hingegen nicht.

(C) Bestimmung der TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Internalisierung

TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen wurden bei 4°C 1h mit Biotin-TNF/Avidin-FITC inkubiert. Anschließend erfolgte in einem Ansatz eine 30minütige Inkubation bei 37°C, während als Kontrolle ein zweiter Ansatz für diese Zeit bei 4°C verblieb. Die Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten. Nach TNF-Stimulation verblieb der TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD auf der Zelloberfläche.

**A**TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSDTNF-R1  $\Delta$ DDTNF-R1  $\Delta$ TRID

Actinomycin D

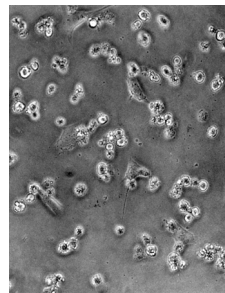
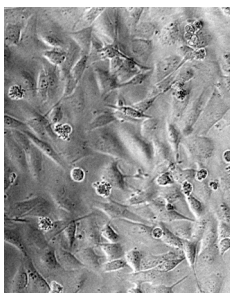
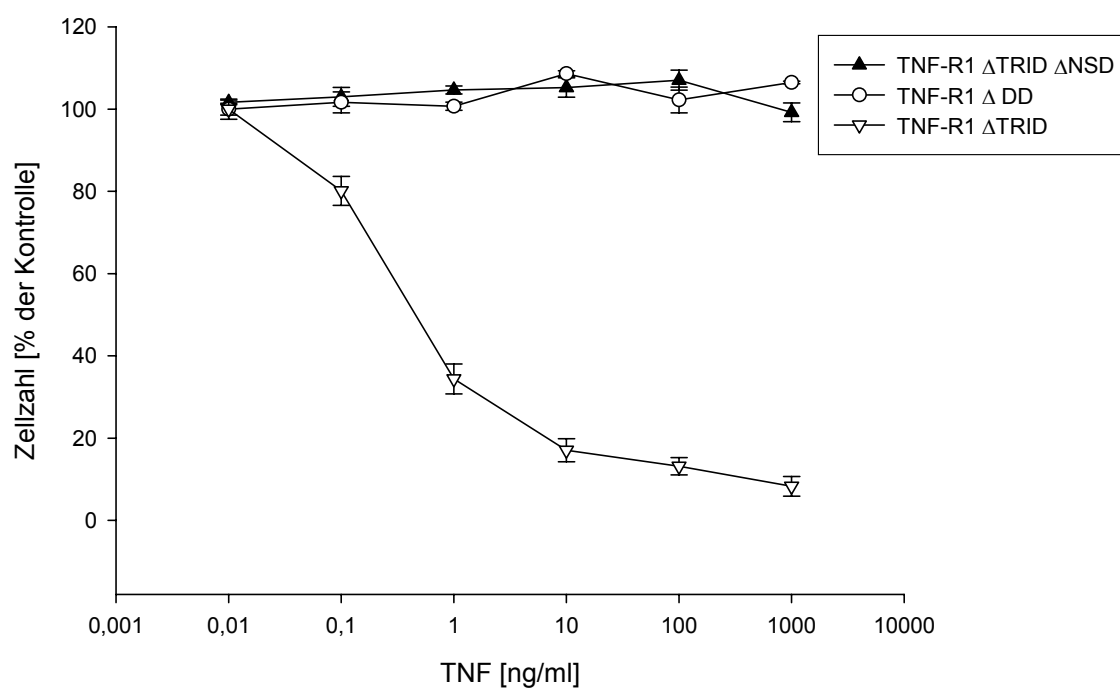
Actinomycin D  
+  
TNF**B**

Abb. 11

**Abb. 11 Bestimmung der TNF-Toxizität in TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen**

(A) Morphologische Bestimmung der TNF-Zytotoxizität

Die Abbildung zeigt repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen nach Stimulation mit TNF. Die Zellen wurden 2h mit 2 $\mu$ g/ml Actinomycin D und anschließend 4h mit 100ng/ml TNF inkubiert. Nach TNF-Stimulation zeigten TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen durchlichtmikroskopisch keine apoptotischen Merkmale. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der entsprechenden Experimente mit TNF-R1  $\Delta$ TRID- und TNF-R1  $\Delta$ DD-Zellen dargestellt.

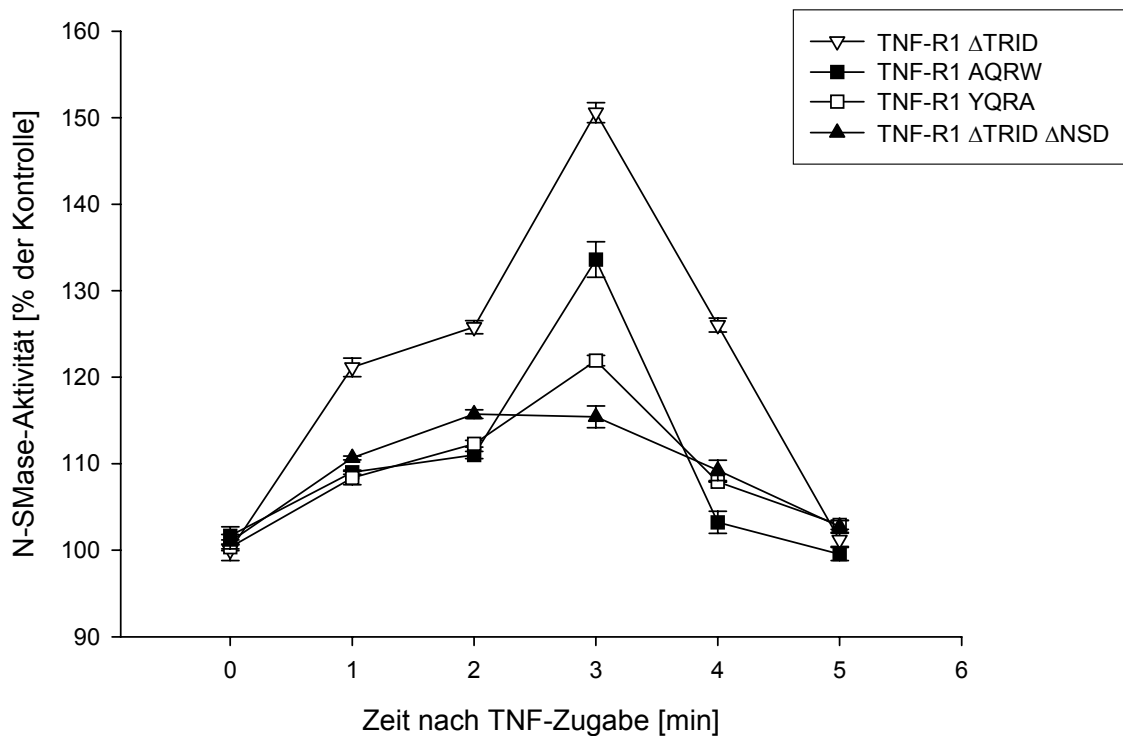
(B) Konzentrationsabhängige Toxizität von TNF in TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen

TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen wurden mit 2 $\mu$ g/ml Actinomycin D für 2h vorinkubiert und anschließend 4h mit TNF in der angegebenen Konzentration stimuliert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus Triplikaten. TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen waren unabhängig von der Konzentration gegenüber TNF resistent. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der entsprechenden Experimente mit TNF-R1  $\Delta$ TRID- und TNF-R1  $\Delta$ DD dargestellt.

**4.1.7 Aktivität der N-SMase nach TNF-Stimulation**

Zur Bestimmung der N-SMase-Aktivität in Zellen mit internalisierungsdefizienten TNF-Rezeptoren wurde die Menge an umgesetztem radioaktiv markiertem Sphingomyelin nach Stimulation der Zellen mit TNF gemessen. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle (Abb. 12).

Nach 3minütiger TNF-Stimulation wiesen TNF-R1  $\Delta$ TRID-, TNF-R1 YQRA- und TNF-R1 AQRW-Zellen eine deutlich erhöhte N-SMase-Aktivität im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen auf. Die Höhe der N-SMase-Aktivität korrelierte dabei mit der beobachteten Sensitivität der Zellen gegenüber TNF. So war die Aktivität der N-SMase in TNF-R1  $\Delta$ TRID-Zellen, die am stärksten apoptotisch auf TNF reagiert hatten, am größten, in TNF-R1 AQRW-Zellen und TNF-R1 YQRW-Zellen, die nicht so stark auf TNF reagiert hatten, hingegen verringert. Erwartungsgemäß zeigten TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen die geringste N-SMase-Aktivität. Damit bestätigte dieses Experiment, dass die beobachtete Hypersensitivität von Zellen mit internalisierungsdefizientem TNF-R1 auf einer erhöhten N-SMase-Aktivität beruhte.



**Abb. 12 Bestimmung der N-SMase-Aktivität nach TNF-Zugabe**

Zellen mit dem jeweiligen TNF-R1-Konstrukt wurden mit 100ng/ml TNF in der angegebenen Zeit stimuliert und nachfolgend homogenisiert. Die Aktivität der N-SMase wurde durch Umsatz an radioaktiv markiertem Sphingomyelin bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus Triplikaten. TNF-R1  $\Delta$ TRID-, TNF-R1 AQRW- und TNF-R1 YQRA-Zellen wiesen nach Stimulation mit TNF eine höhere N-SMase-Aktivität als TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD-Zellen auf.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen eine Rekrutierung des DISC an den TNF-R1 zur Apoptoseinduktion nur nach erfolgter Endozytose des Rezeptors möglich ist. Dabei konnte die Aminosäuresequenz identifiziert werden, die allein für die Internalisierung des TNF-R1 verantwortlich ist. Sie befindet sich innerhalb einer für die Internalisierung notwendigen Domäne (TRID) und entspricht dem weit verbreiteten Internalisierungsmotiv YXX $\Phi$ . Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion der gesamten TRID oder eine Mutation innerhalb des Internalisierungsmotivs die Rezeptorendozytose blockiert und damit die DISC-Rekrutierung und Apoptose verhindert werden. Weiterhin konnte in Zellen mit internalisierungsdefizienten TNF-Rezeptoren ein

DISC-unabhängiger Signalweg der TNF-induzierten Apoptose gefunden werden. Hierbei kommt es unter den Bedingungen der TNF-R1-Internalisierungsdefizienz zu einer starken Aktivitätserhöhung der zellmembranständigen N-SMase, eines Enzyms, welches proapoptotische Ceramide erzeugt.

Da mit der TNF-R1-Internalisierung eine unabdingbare Voraussetzung für die TNF-induzierte Apoptose gefunden werden konnte, sollte im Folgenden untersucht werden, inwieweit die TNF-R1-Internalisierung bei der TNF-induzierten Apoptose virenfizierter Zellen von Bedeutung sein könnte.

## 4.2 Untersuchungen zur E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz

Im Laufe der Evolution haben Viren verschiedene Strategien gegen die Immunantworten des Wirts entwickelt. Adenoviren verwenden einen großen Teil ihres Genoms zur Kodierung von Proteinen, die in vielfältiger Weise immunmodulatorisch wirken. Die Expression von Proteinen der E1A- und E1B-Region des adenoviralen Genoms führen zur Transformation der Wirtszelle (Berk, 2005). Als Folge der Transformation wird die Zelle für die todesrezeptor-induzierte Apoptose suszeptibel (Schaack, 2005). In humanen Zellen verhindern Adenoviren die Apoptoseinduktion durch Expression des Bcl-2-Homologs E1B-19K (Gooding *et al.*, 1991; Sundararajan und White, 2001). Darüber hinaus besitzen Adenoviren in der E3-Region noch weitere Proteine, die eine rezeptorinduzierte Apoptose blockieren. Zu ihnen gehören E3-10.4K und E3-14.5K, die zusammen einen Komplex (RID) bilden, der die Oberflächenexpression von Fas, TRAIL-R und TNF-R1 minimiert (Fessler *et al.*, 2004; Tollefson *et al.*, 1998; Tollefson *et al.*, 2001).

Ein weiteres Protein der E3-Region ist E3-14.7K, von dem gezeigt werden konnte, dass es Mauszellen vor TNF-induzierter Apoptose schützt (Gooding *et al.*, 1988; Gooding *et al.*, 1990). Allerdings blieb bis heute offen, welcher Mechanismus der E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz zugrunde liegt.

### 4.2.1 Vorarbeiten

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die TNF-R1-Internalisierung für die TNF-induzierte Apoptose unabdingbar ist. Dies ließ vermuten, dass die TNF-Resistenz vermittelnde Wirkung von E3-14.7K auf einer Blockierung der TNF-R1-Internalisierung beruhen könnte. Daher wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe die Internalisierung des TNF-R1 in E3-14.7K exprimierenden Mausfibroblasten mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Es zeigte sich, dass der TNF-R1 in Zellen, die E3-14.7K exprimierten, nach TNF-Stimulation nicht mehr internalisierte. Der TNF-R1 von Zellen hingegen, die eine funktionslose Mutante des E3-14.7K (Ranheim *et al.*,

1993) exprimierten, internalisierte weiterhin. Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass die Blockierung der TNF-R1-Internalisierung durch Expression von E3-14.7K zur Verhinderung der DISC-Rekrutierung und damit zur TNF-Resistenz führt. Die Expression der E3-14.7K-Mutante hatte keine Blockierung der DISC-Rekrutierung und der Apoptoseinduktion zur Folge. Damit bewiesen die Experimente zur Funktion von E3-14.7K die im ersten Teil der vorliegenden Arbeit gemachten Ergebnisse zur Abhängigkeit der TNF-induzierten Apoptose von der Internalisierung des TNF-R1. Die verschiedenen Ansätze zur Blockierung der Rezeptorinternalisierung, zum einen Mutagenese des Rezeptors, zum anderen Expression eines viralen Proteins, hatten jeweils zum Ausbleiben der DISC-Rekrutierung und zur TNF-Resistenz geführt.

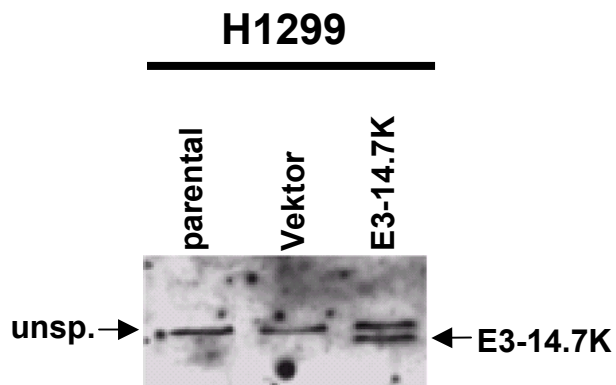
Im Folgenden sollte nun geprüft werden, ob durch Expression von E3-14.7K in humanen Zellen ebenfalls TNF-R1-Internalisierung, DISC-Rekrutierung und Apoptoseinduktion blockiert werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob dieser Mechanismus der E3-14.7K-vermittelten Resistenz auch unter den pathophysiologischen Bedingungen einer Virusinfektion wirksam ist.

#### **4.2.2 Mechanismus der E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz in humanen E3-14.7K-Zellen**

##### **4.2.2.1 Herstellung humaner E3-14.7K-Zellen**

Um zu prüfen, ob humane Zellen vor TNF-induzierter Apoptose durch dieselben Mechanismen wie murine Zellen geschützt werden, wurden humane H1299-Zellen hergestellt, die E3-14.7K stabil exprimierten. Dazu wurde analog zu 4.1.2 das Gen für E3-14.7K durch retrovirale Transduktion in die Zellen eingebracht. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Expression von E3-14.7K durch *Western Blotting* überprüft (Abb. 13). Als Kontrollen wurden nicht transduzierte parentale H1299-Zellen und H1299-Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor transduziert worden waren, eingesetzt.



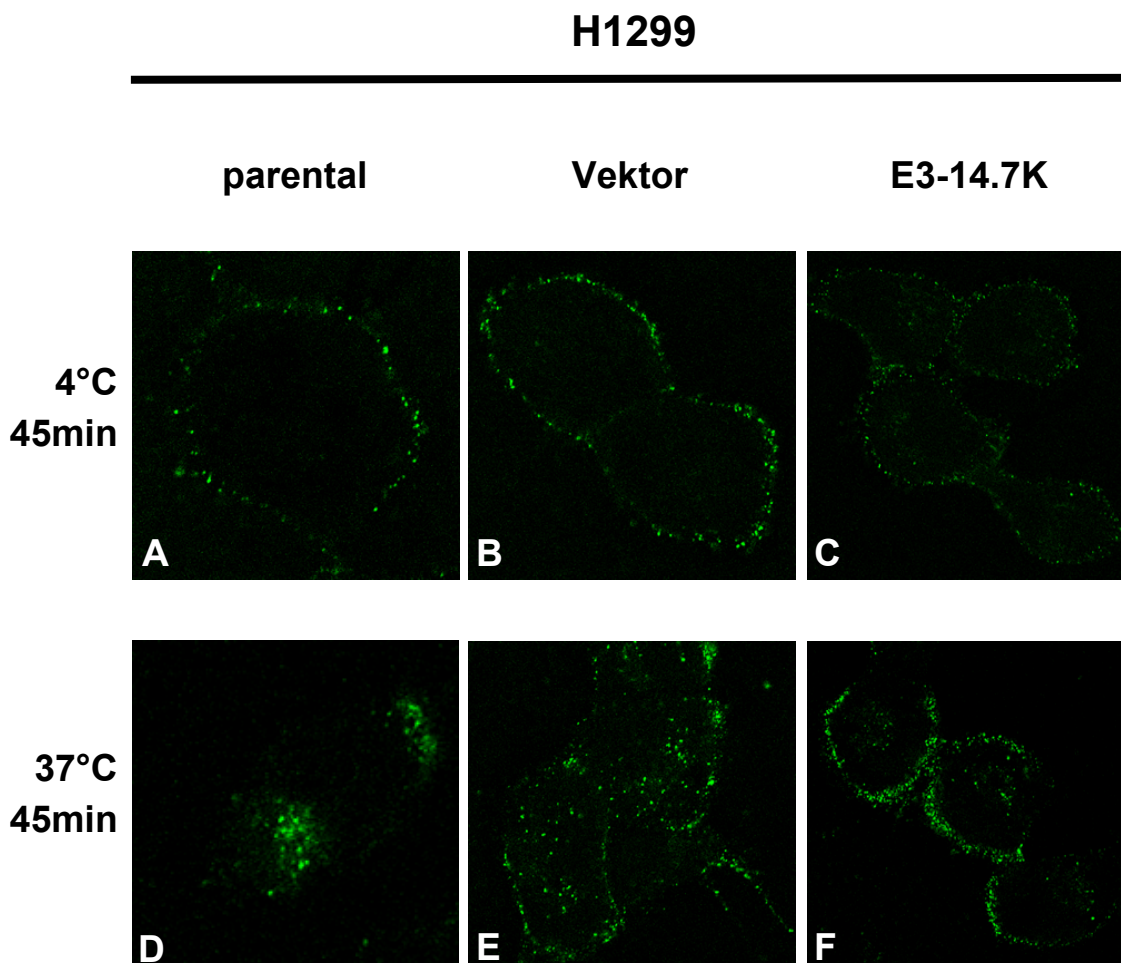


**Abb. 13 Expression von E3-14.7K in H1299-Zellen**

H1299-Zellen wurden mit E3-14.7K oder mit dem Expressionsvektor allein stabil transduziert. Als Kontrolle wurden nicht transduzierte parentale H1299-Zellen verwendet. Nach der Transduktion wurden die Zellen lysiert und die Expression von E3-14.7K durch *Western Blotting* nachgewiesen. Nur E3-14.7K-transduzierte Zellen exprimierten E3-14.7K. Zusätzlich ist in allen Auftragsungen eine unspezifische Bande (unsp.) zu sehen.

#### 4.2.2.2 TNF-R1-Internalisierung in humanen E3-14.7K-Zellen

Nach Herstellung der humanen E3-14.7K-Zellen wurde untersucht, ob in ihnen die Internalisierung des TNF-R1 durch Expression von E3-14.7K blockiert wird. Als Kontrollen wurden nicht transduzierte parentale H1299-Zellen und H1299-Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor transduziert worden waren, eingesetzt. Die Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF/Avidin-FITC stimuliert und die Internalisierung des TNF-R1 mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Sowohl bei parentalen H1299-Zellen, Vektor-Zellen als auch bei E3-14.7K-Zellen befand sich der TNF-R1 nach einer weiteren 45minütigen Inkubation bei 4°C ausschließlich an der Zellmembran (Abb. 14, A-C). Wurden die Zellen nach Stimulation mit Biotin-TNF/Avidin-FITC 45min bei 37°C inkubiert, internalisierte der TNF-R1 in parentalen H1299- und Vektor-Zellen vollständig (Abb. 14, D und E), während der TNF-R1 in E3-14.7K-Zellen direkt an oder in der Nähe der Zellmembran verblieb (Abb. 14F). Damit zeigten diese Ergebnisse, dass in humanen Zellen eine Expression von E3-14.7K ebenso wie in murinen Zellen zu einer vollständigen Blockierung der TNF-R1-Internalisierung führt.



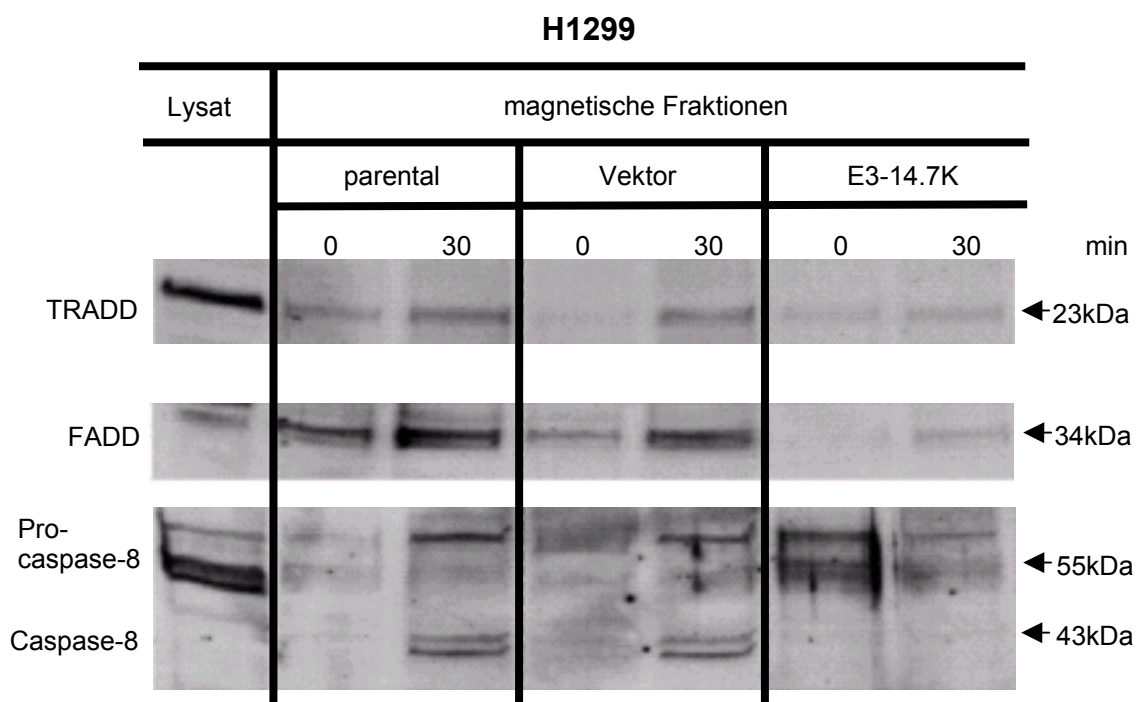
**Abb. 14 TNF-R1-Internalisierung in humanen E3-14.K-Zellen**

H1299-Zellen wurden bei 4°C 1h mit Biotin-TNF/Avidin-FITC inkubiert. Anschließend erfolgte in einem Ansatz eine 45minütige Inkubation bei 37°C (D-F), während als Kontrolle ein zweiter Ansatz für diese Zeit bei 4°C verblieb (A-C). Die Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten. Nach 45minütiger Inkubation bei 4°C zeigten alle Zellen ausschließlich membranständige TNF-Rezeptoren (A-C). Eine Inkubation für 45min bei 37°C führte bei parental H1299-Zellen und Vektor-Zellen zur Internalisierung des TNF-R1 (D und E), während der TNF-R1 in E3-14.7K-Zellen an der Zelloberfläche verblieb (F).

#### 4.2.2.3 DISC-Rekrutierung in humanen E3-14.7K-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in humanen Zellen E3-14.7K die TNF-R1-Internalisierung blockiert, sollte untersucht werden, ob es dadurch, wie in murinen Zellen, zu einer Verhinderung der DISC-Rekrutierung kommt. Dazu wurden 30min nach Stimulation mit TNF aus humanen E3-14.7K-Zellen analog

zu 4.1.4 immunomagnetisch markierte TNF-R1-Fraktionen isoliert. Parallel wurden Kontrollansätze mit nicht transduzierten parental H1299-Zellen und H1299-Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor transduziert worden waren, durchgeführt. Nach TNF-Stimulation konnte in TNF-R1-Fraktionen aus parental H1299-Zellen und in Vektor-Zellen TRADD, FADD und Caspase-8 nachgewiesen werden. Caspase-8 wurde sowohl in der 55kDa- als auch in der prozessierten 43kDa-Isoform gefunden. Im Gegensatz dazu konnte in den isolierten TNF-R1-Fraktionen aus E3-14.7K-Zellen keine Rekrutierung von TRADD, FADD und Caspase-8 an den TNF-R1 festgestellt werden. Damit zeigten diese Ergebnisse, dass E3-14.7K auch in humanen Zellen die DISC-Rekrutierung durch eine Blockierung der TNF-R1-Internalisierung verhindert.



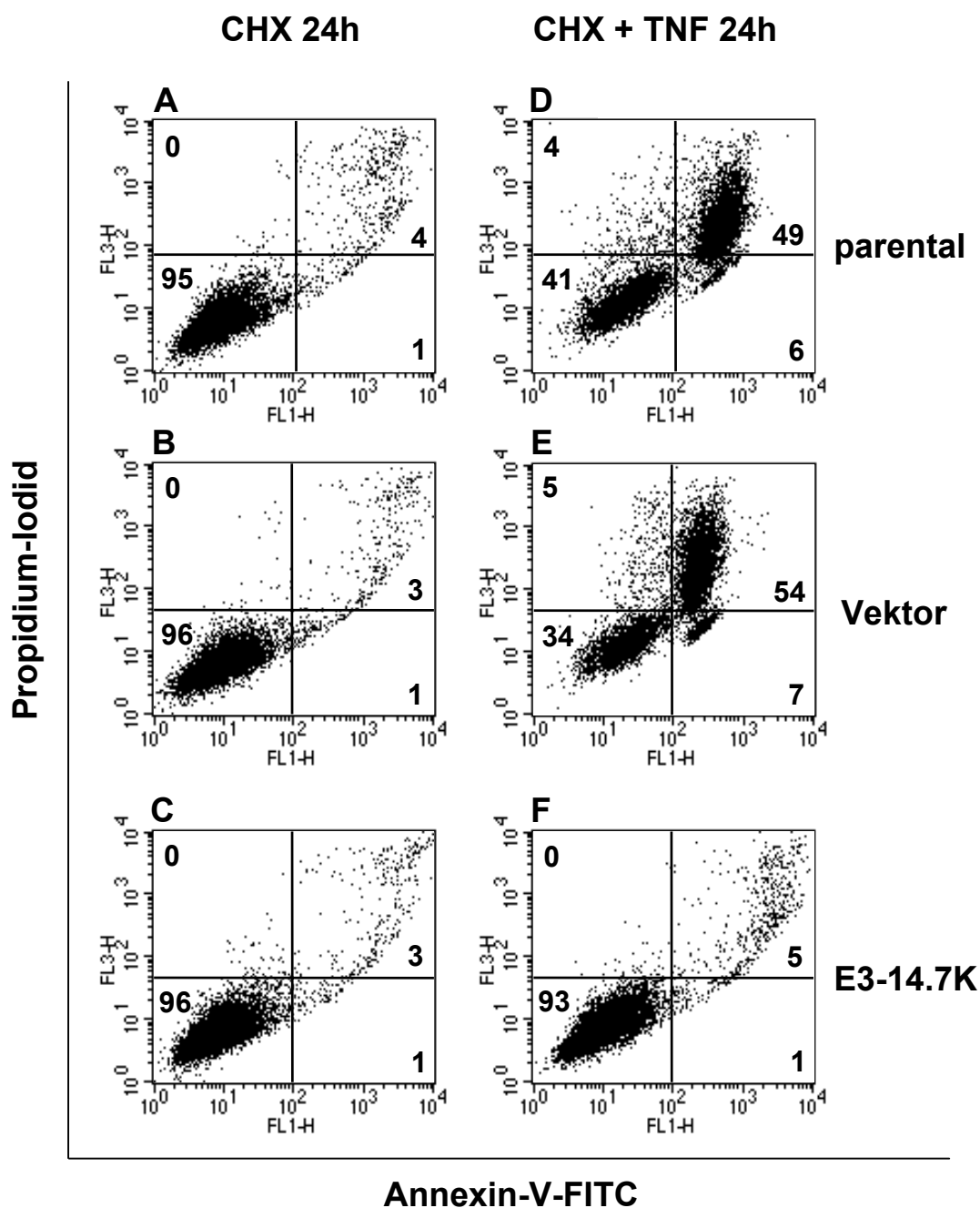
**Abb. 15 DISC-Rekrutierung in humanen E3-14.K-Zellen**

H1299-Zellen wurden nach 30minütiger Stimulation mit metallpartikelmarkiertem TNF schonend homogenisiert und die magnetischen Fraktionen mit Hilfe einer *Free-Flow-Magnetkammer* isoliert. Jeweils gleiche Mengen der einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Anwesenheit von TRADD, FADD und Caspase-8 durch *Western Blotting* geprüft. Als Expressionskontrolle wurde zelluläres Lysat aufgetragen. In TNF-R1-Fraktionen aus parental H1299-Zellen und Vektor-Zellen konnten TRADD, FADD und Caspase-8 nachgewiesen werden. In E3-14.7K-Zellen hingegen blieb die DISC-Rekrutierung aus.

#### 4.2.2.4 TNF-Resistenz humaner E3-14.7K-Zellen

Bis heute war unklar, ob E3-14.7K humane Zellen vor TNF-induzierter Apoptose schützen kann (Gooding *et al.*, 1991; Lichtenstein *et al.*, 2004). Daher sollte überprüft werden, ob die in humanen Zellen beobachtete Blockierung der TNF-R1-Internalisierung und der DISC-Rekrutierung durch E3-14.7K TNF-Resistenz vermittelt. Dazu wurden E3-14.7K-exprimierende H1299-Zellen entweder allein mit CHX oder mit CHX und TNF behandelt. Der Proteinbiosynthesehemmer CHX wurde eingesetzt, um die Zellen gegenüber TNF zu sensibilisieren (vgl. 4.1.5.1). Als Kontrollen wurden nicht transduzierte parentale H1299-Zellen und mit dem leeren Expressionsvektor transduzierte H1299-Zellen verwendet. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Während CHX allein in H1299-Zellen nicht zytotoxisch wirkte (Abb. 16, A-C), führte die Behandlung von parentalen H1299-Zellen und Vektor-Zellen mit CHX und TNF zur Induktion von Apoptose (Abb. 16, D und E). Demgegenüber waren E3-14.7K-Zellen TNF-resistent (Abb. 16F). Diese Ergebnisse zeigten, dass E3-14.7K auch humane Zellen vor TNF-induzierter Apoptose schützt.

## H1299



**Abb. 16 TNF-Resistenz humaner E3-14.7K-Zellen**

Die angegebenen Zellen wurden 24h mit CHX (12µg/ml) allein oder mit CHX (12µg/ml) und TNF (100ng/ml) behandelt. Anschließend erfolgte eine Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC und Propidium-Iodid und die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate. CHX allein verursachte keine Apoptose (A-C). Während in nicht transduzierten parental H1299-Zellen und in H1299-Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor transduziert worden waren, durch Behandlung mit TNF und CHX Apoptose induziert wurde (D, E), waren E3-14.7K-Zellen TNF-resistent (F).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass E3-14.7K humane Zellen aufgrund einer Blockierung der TNF-R1-Internalisierung und damit einer Verhinderung der DISC-Rekrutierung vor TNF-induzierter Apoptose schützt. Somit konnte der in murinen Zellen beobachtete Mechanismus der E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz in humanen Zellen bestätigt werden. In den Versuchen sowohl mit murinen als auch mit humanen Zellen wurde E3-14.7K überexprimiert. Im Folgenden sollte darum untersucht werden, ob E3-14.7K auch unter den pathophysiologischen Bedingungen einer Adenovirusinfektion TNF-Resistenz durch Blockierung der TNF-R1-Internalisierung vermittelt.

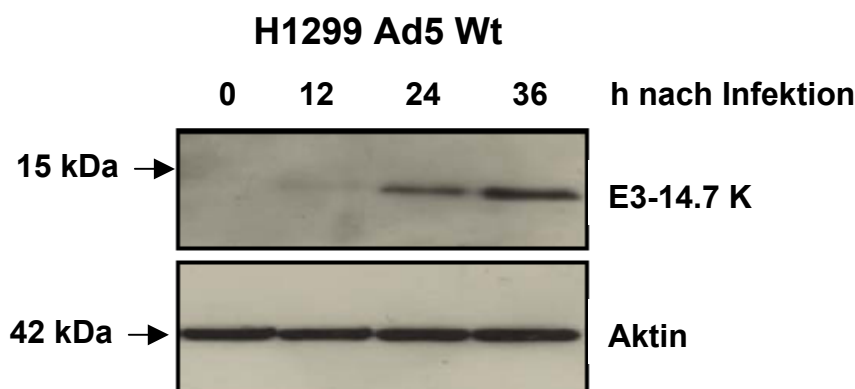
#### **4.2.3 Mechanismus der E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz in infizierten humanen Zellen**

Nach den Experimenten mit E3-14.7K-transduzierten H1299-Zellen sollte untersucht werden, ob E3-14.7K auch unter den pathophysiologischen Bedingungen einer Infektion TNF-Resistenz durch Blockierung der TNF-R1-Internalisierung vermittelt. Dabei stellte sich das Problem, dass Adenoviren außer E3-14.7K noch weitere Proteine besitzen, die eine TNF-induzierte Apoptose verhindern. Die Expression von E1B-19K schützt humane Zellen vor TNF, indem es als Bcl-2-Homolog zusammen mit Bax und Bak die mitochondrienabhängige Apoptose inhibiert (Sundararajan und White, 2001; Sundararajan *et al.*, 2001). Mehrere Studien zeigten, dass in humanen Zellen unabhängig von E1B-19K mindestens ein Protein der E3-Region TNF-Resistenz vermittelt und dass es sich hierbei wahrscheinlich um E3-14.7K handelt (Gooding *et al.*, 1988; Gooding *et al.*, 1991). Allerdings wurde auch von den E3-Proteinen E3-10.4K/E3-14.5K und E3-6.7K eine Apoptose inhibierende Wirkung nach TNF-Stimulation beschrieben (Chin und Horwitz, 2005; Moise *et al.*, 2002). Um zeigen zu können, dass E3-14.7K als einziges E3-Protein humane Zellen vor TNF schützt, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Thomas Dobner zwei Mutanten des Adenovirus Typ 5 (Ad5) hergestellt. Eine Adenovirusmutante war durch Einfügen mehrerer Stopkodons E1B-19K-defizient und besaß zudem keine E3-Region (Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup>). Die

Versuche mit dieser Mutante sollten zeigen, ob außerhalb der E3-Region neben E1B-19K noch weitere Proteine für die TNF-Resistenz in humanen Zellen eine Rolle spielen. Die zweite hergestellte Mutante (Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K) war ebenfalls E1B-19K-defizient und besaß durch Austausch von Cystein119 gegen Serin ein funktionsloses E3-14.7K (Ranheim *et al.*, 1993). Die Versuche mit Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K sollten darüber Aufschluss geben, ob innerhalb der E3-Region ausschließlich E3-14.7K Resistenz gegenüber TNF vermittelt. Als Kontrolle sollten alle Experimente mit Wildtyp-Adenoviren (Ad5 WT) durchgeführt werden.

#### 4.2.3.1 Wahl der Infektionsbedingungen

Um Aussagen über Funktion und Wirkungsweise von E3-14.K in Ad5-infizierten Zellen machen zu können, war es zunächst nötig zu bestimmen, ab welchem Zeitpunkt nach Infektion E3-14.7K exprimiert wurde. Daher wurden H1299-Zellen mit Ad5 WT infiziert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert. Anschließend wurde mittels *Western Blotting* die Expression von E3-14.K überprüft (Abb. 17). Die Infektion wurde mit einer MOI 100, d.h. mit 100 infektiösen Partikeln pro Zelle, durchgeführt. 12h nach Infektion war nur eine sehr schwache Expression von E3-14K zu erkennen. 24h nach Infektion hingegen war die Expression deutlich nachweisbar und nahm nach weiteren 12h noch zu.



**Abb. 17 Expression von E3-14.7K in Ad5-infizierten H1299-Zellen**

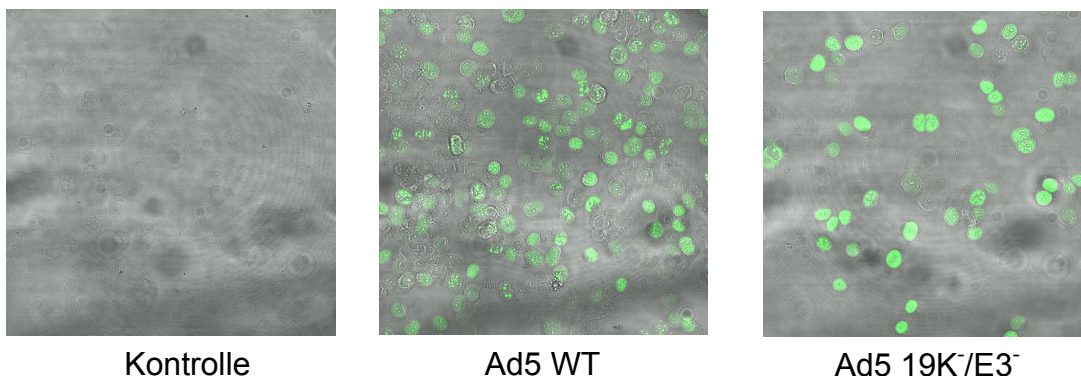
H1299-Zellen wurden mit Ad5 WT (MOI 100) infiziert und an den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion lysiert. Anschließend wurden die Zelllysate mittels SDS-PAGE und *Western Blotting* auf die Expression von E3-14.7K geprüft. Zur Kontrolle gleichmäßiger Beladung des Gels mit Zelllysaten erfolgte zudem ein Nachweis von Aktin. 24h nach Infektion war die Expression von E3-14.7K deutlich nachweisbar.

Um sicherzustellen, dass eine MOI 100 auch ausreichend ist, um möglichst alle Zellen zu infizieren, wurden die Zellen 24h nach Infektion fixiert und die Infektionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (Abb. 18). Die Zellen wurden mit Ad5 WT oder mit Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup> infiziert, um zu klären, ob ein Fehlen von E1B-19K und der E3-Region Einfluss auf die Infektiosität der Viren hatte.

Es konnte gezeigt werden, dass eine MOI 100 ausreichte, um nahezu alle Zellen zu infizieren, und dass eine Deletion der E3-Region zu keiner Abnahme der Infektiosität führte.



## H1299



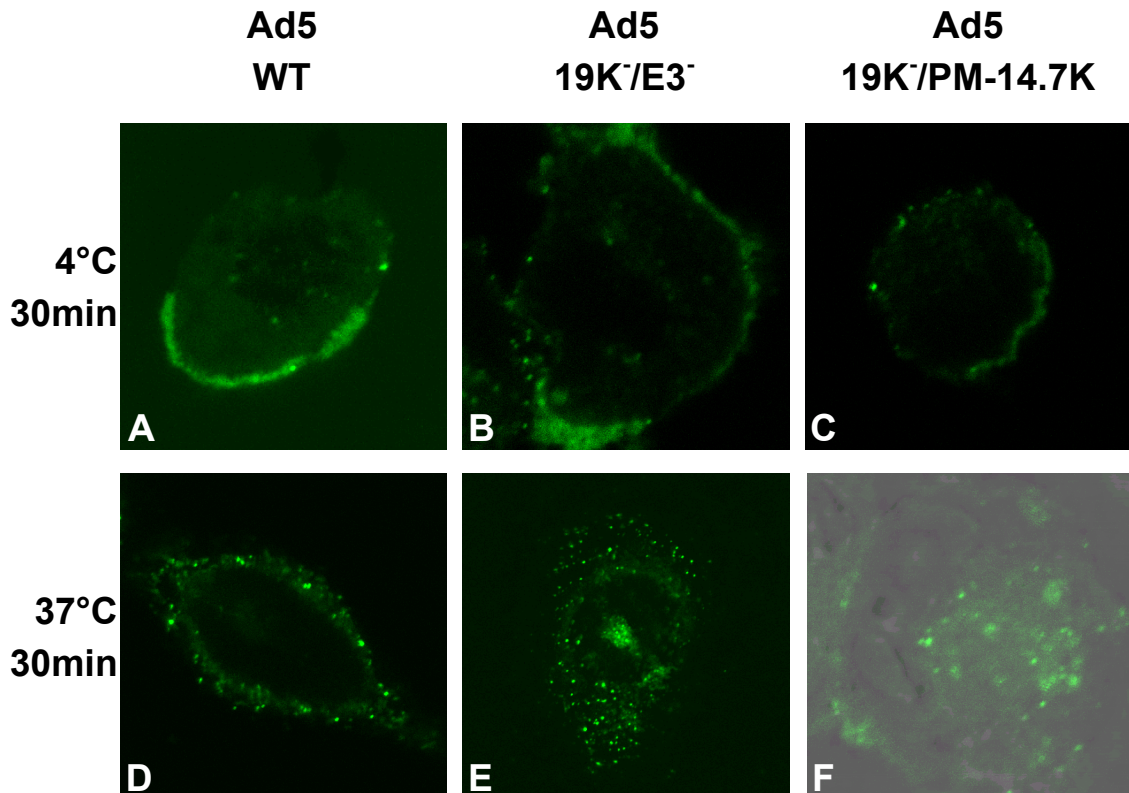
**Abb. 18 Infektion von H1299-Zellen mit Ad5**

Die Zellen wurden 24h nach Infektion mit einer MOI 100 mit Methanol fixiert. Danach erfolgte zunächst eine Inkubation mit einem Anti-E2A-Antikörper und anschließend eine weitere mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. Als Kontrolle für die spezifische Färbung diente ein Ansatz mit nicht infizierten Zellen. Dargestellt ist jeweils eine Überlagerung aus durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Nahezu alle Zellen ließen sich mit Ad5 WT oder Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup> infizieren.

### 4.2.3.2 TNF-R1-Internalisierung in Ad5-infizierten Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von E3-14.K auf die Internalisierung des TNF-R1 im Kontext einer Infektion humaner Zellen mit Adenovirus Typ 5 wurden H1299-Zellen jeweils mit Ad5 WT, Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup> und Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K infiziert und 24h nach Infektion zunächst 1h bei 4°C mit Biotin-TNF/Avidin-FITC vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C. Als Kontrolle wurde parallel zu jedem Ansatz ein weiterer ohne Temperaturerhöhung durchgeführt. Die Internalisierung des TNF-R1 in Ad5 WT-Zellen war vollständig blockiert (Abb. 19D), ähnlich wie die der TNF-R1-Konstrukte, die ein deletiertes oder mutiertes Internalisierungsmotiv besaßen (vgl. Abb. 6). Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C verblieb der TNF-R1 an der Zelloberfläche, intrazellulär waren keine TNF-R1-beladenen Vesikel beobachtbar. Demgegenüber konnte bei Zellen, die mit einer der beiden Ad5-Mutanten infiziert worden waren, nach 30minütiger Inkubation bei 37°C eine deutliche intrazelluläre Anhäufung TNF-R1-positiver Vesikel beobachtet werden, während an der Zellmembran nahezu kein TNF-R1 verblieben war (Abb. 19, E und F). Diese Ergebnisse zeigten, dass E3-14.7K unter den

pathophysiologischen Bedingungen einer Infektion die TNF-R1-Internalisierung blockiert und bestätigten damit die Experimente mit murinen und humanen Zellen, bei denen eine alleinige Überexpression von E3-14.7K zur Verhinderung der TNF-R1-Internalisierung geführt hatte.



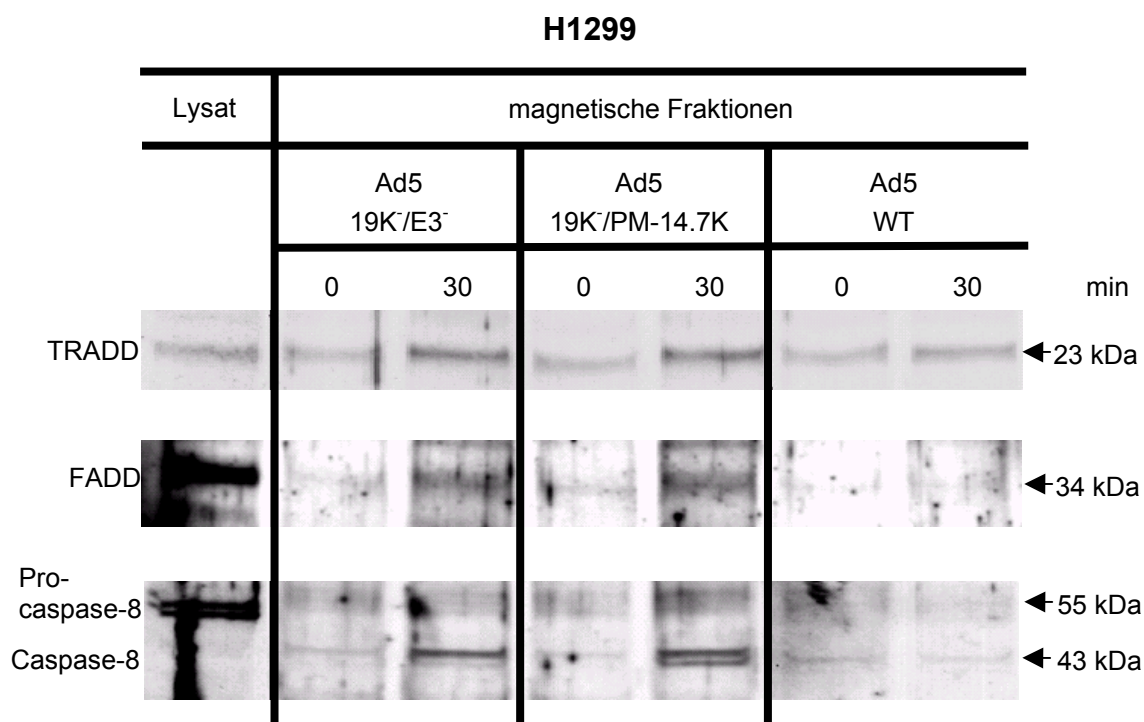
**Abb. 19 TNF-R1-Internalisierung in Ad5-infizierten H1299-Zellen**

H1299-Zellen wurden mit Ad5 WT, Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup> oder mit Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K mit einer MOI 100 infiziert und nach 24h zunächst 1h bei 4°C mit Biotin-TNF/Avidin-FITC vorinkubiert. Anschließend erfolgte bei einem Ansatz eine Inkubation für 30min bei 37°C, während bei einem zweiten Ansatz die Temperatur unverändert blieb. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten. Nach 30minütiger Inkubation bei 4°C befand sich der TNF-R1 aller Zellen ausschließlich an der Zellmembran (A-C). Während nach 30minütiger Inkubation bei 37°C der TNF-R1 von Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup>- und Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K-infizierten Zellen vollständig internalisierte (E und F), verblieb der TNF-R1 von Ad5 WT-infizierten Zellen an der Zellmembran (D).

#### 4.2.3.3 DISC-Rekrutierung in Ad5-infizierten H1299-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach einer Infektion humaner Zellen mit Ad5 WT die Internalisierung des TNF-R1 durch E3-14.7K verhindert wird, sollte nun festgestellt werden, ob die Internalisierungsblockierung zu einem Ausbleiben der DISC-Rekrutierung führt. Dazu wurden H1299-Zellen mit Ad5 WT, Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup> und Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K infiziert und 24h nach Infektion mit TNF stimuliert. Anschließend wurden aus den Zellen immunomagnetisch markierte TNF-R1-Fraktionen isoliert und die Assoziation des DISC an den TNF-R1 untersucht (Abb. 20). Der TNF-R1 von Ad5 WT-infizierten H1299-Zellen rekrutierte nach TNF-Stimulation weder TRADD, FADD noch Caspase-8. Nach 30minütiger Inkubation der Zellen bei 37°C konnten keine größeren Mengen der jeweiligen Proteine in den isolierten Fraktionen nachgewiesen werden als in den entsprechenden Fraktionen aus Zellen, die durchgängig bei 4°C inkubiert worden waren. Sowohl Ad5-Mutanten ohne E3-Region als auch Ad-5-Mutanten mit funktionslosem E3-14.7K waren nicht in der Lage, die DISC-Rekrutierung zu blockieren.

Diese Experimente zeigten, dass nach einer adenoviralen Infektion humaner Zellen E3-14.7K durch Blockierung der TNF-R1-Internalisierung die DISC-Bildung verhindert. Die Notwendigkeit der TNF-R1-Internalisierung für die DISC-Rekrutierung war im ersten Teil dieser Arbeit durch eine genetische Veränderung des TNF-R1, also durch einen völlig anderen Ansatz, gezeigt worden. Die Untersuchungen an adenoviral infizierten Zellen bewiesen die physiologische Relevanz der TNF-R1-Internalisierung für die DISC-Bildung.



**Abb. 20 DISC-Rekrutierung in Ad5-infizierten H1299-Zellen.**

H1299-Zellen wurden entweder mit Ad5 WT, Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup> oder mit Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K mit einer MOI 100 infiziert und nach 24h mit metallisch markiertem TNF stimuliert. Nach 30min wurden die Zellen schonend homogenisiert und die magnetisch markierten Fraktionen mittels einer *Free-Flow*-Magnetkammer isoliert. Anschließend wurden die Proteine der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Anwesenheit von TRADD, FADD und Caspase-8 durch einen *Western Blot* geprüft. Als Expressionskontrolle wurde Lysat aus nicht infizierten und nicht stimulierten H1299-Zellen aufgetragen. In Ad5 WT-infizierten Zellen wurde der DISC nach TNF-Stimulation nicht mehr rekrutiert. Ad5-Mutanten ohne E3-Region oder mit funktionslosem E3-14.7K waren nicht in der Lage, die DISC-Rekrutierung zu verhindern.

#### **4.2.3.4 E3-14.7K-vermittelte TNF-Resistenz in Ad5-infizierten H1299-Zellen**

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass E3-14.7K-transduzierte humane Zellen TNF-resistent sind, sollte die protektive Wirkung von E3-14.7K in infizierten humanen Zellen geprüft werden. Zugleich sollte festgestellt werden, ob E3-14.7K als einziges E3-Protein TNF-Resistenz vermittelt. Dazu wurden Ad5 WT-, Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup>- und Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K-infizierte H1299-Zellen mit CHX, TNF, CHX und TNF oder nur mit Medium behandelt. Anschließend wurde die jeweilige Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. CHX allein führte bei keinen Zellen zur Apoptose (Abb. 21, B,D und F). TNF allein und zusammen mit CHX induzierte bei Ad5 19K<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup>- und Ad5 19K<sup>-</sup>/PM-14.7K-infizierten H1299-Zellen Apoptose (Abb. 21, C-F). Der zytotoxische Effekt von TNF allein ist auf die Expression des transformierenden Proteins E1A 289R zurückzuführen, das in Abwesenheit Apoptose inhibierender viraler Proteine Zellen für die TNF-induzierte Zelllyse sensibilisiert (Gooding *et al.*, 1988; Gooding *et al.*, 1991). Ad5 WT-infizierte H1299-Zellen hingegen erwiesen sich als TNF-resistent, sowohl bei alleiniger Stimulation mit TNF als auch zusammen mit CHX (Abb. 21, A und B). Diese Ergebnisse zeigten, dass E3-14.7K außer E1B-19K als einziges adenovirales Protein infizierte humane Zellen vor TNF-induzierter Apoptose schützt. Dies heißt auch, dass neben E3-14.7K kein weiteres E3-Protein TNF-Resistenz vermittelt.

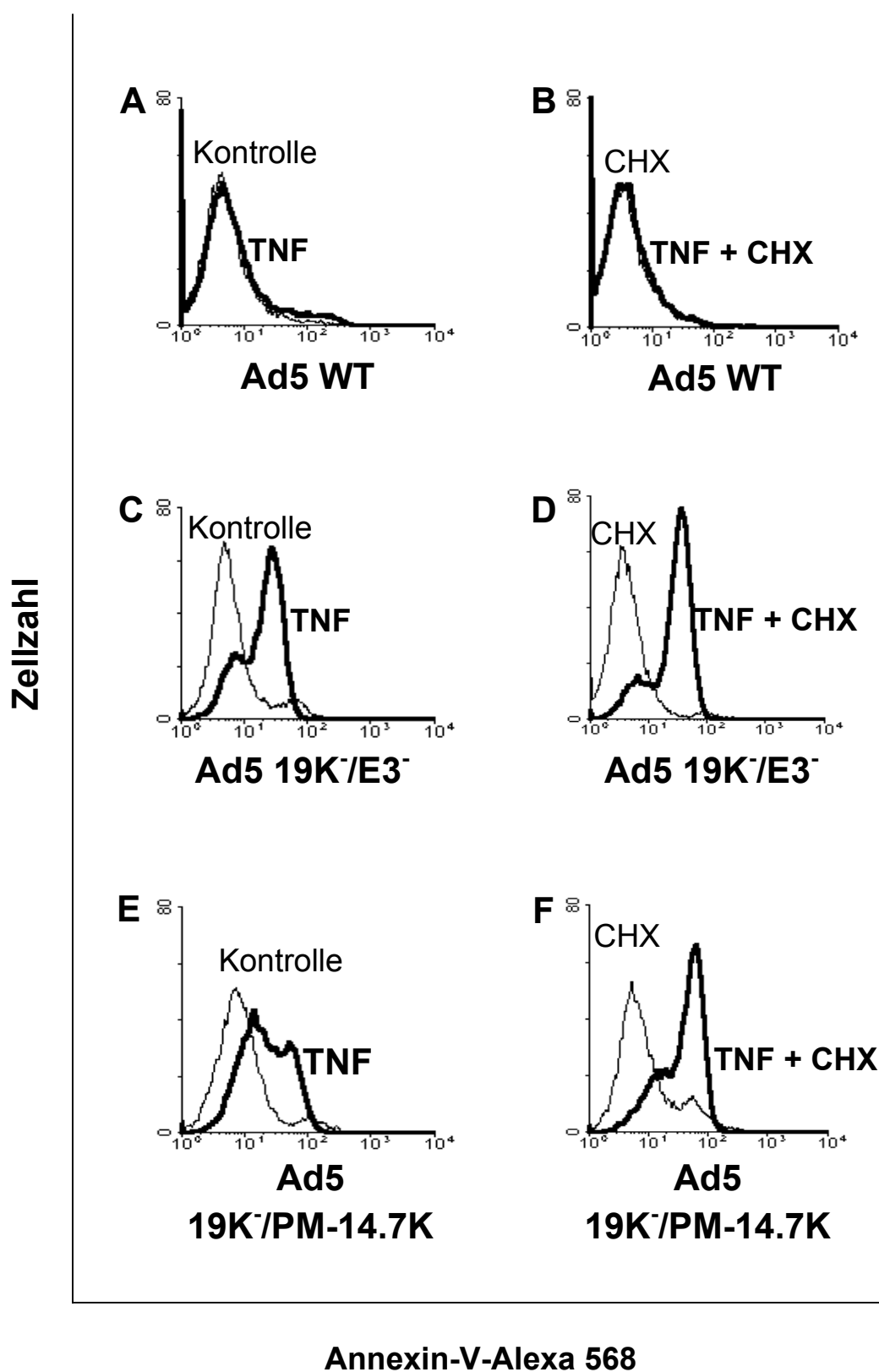


Abb. 21

**Abb. 21 E3-14.7K-vermittelte TNF-Resistenz in Ad5-infizierten H1299-Zellen**

Ad5-infizierte H1299-Zellen wurden jeweils 24h nach Infektion mit einer MOI 100 für weitere 18h entweder mit TNF, CHX, CHX und TNF oder Medium (Kontrolle) behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit Annexin-V-Alexa 568 inkubiert und die Anzahl der apoptotischen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Messergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Ad5 WT-infizierte Zellen reagierten weder auf TNF allein noch zusammen mit CHX apoptotisch (A und B). In Ad5 19K/E3<sup>-</sup>- und Ad5 19K/PM-14.7K infizierten Zellen hingegen induzierte TNF in An- und Abwesenheit von CHX Apoptose (C-F).

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in humanen Zellen die Expression von E3-14.7K zur TNF-Resistenz aufgrund einer Blockierung der TNF-R1-Internalisierung und damit der DISC-Rekrutierung führt. Der Mechanismus der E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz konnte sowohl in E3-14.7K-transduzierten Zellen als auch unter den Bedingungen einer Infektion demonstriert werden. Damit konnte die physiologische Relevanz der zuvor lediglich durch Mutation des TNF-R1 gezeigten Abhängigkeit der DISC-Rekrutierung und Apoptoseinduktion von der TNF-R1-Internalisierung belegt werden. Zudem wurde festgestellt, dass E3-14.7K als einziges E3-Protein humane Zellen vor TNF schützt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Abhängigkeit der TNF-induzierten Apoptose von der Internalisierung des TNF-R1

TNF ist ein Zytokin, das vielfältige zellbiologische und immunologische Funktionen erfüllt. Zellen können auf TNF-Behandlung u.a. mit Proliferation, Differenzierung, der Ausschüttung anderer Zytokine oder apoptotisch reagieren (Wajant *et al.*, 2003). Für die Induktion von Apoptose durch TNF ist der TNF-R1 verantwortlich (Aggarwal, 2003). Er ist der Prototyp der 29 Mitglieder umfassenden TNF-Rezeptor-Superfamilie (Aggarwal, 2003). Der TNF-R1 ist zudem ein Vertreter der Todesrezeptoren, die allesamt zur TNF-Rezeptor-Superfamilie zählen. Als gemeinsames Merkmal besitzen Todesrezeptoren eine intrazelluläre Todesdomäne, an die nach Aktivierung des Rezeptors der *death inducing signaling complex* (DISC), bestehend aus FADD und Caspase-8, rekrutiert wird (Muzio *et al.*, 1996). Während der Bildung des DISC kommt es zu einer autokatalytischen Aktivierung von Caspase-8 und nachfolgend zur Aktivierung weiterer Caspasen, was letztlich zur Einleitung der Apoptose führt (Hirata *et al.*, 1998). Für den TNF-R1 wird ebenfalls eine DISC-Rekrutierung angenommen, bei der aber FADD nicht direkt an den Rezeptor bindet, wie bei Fas und TRAIL-R1 (Danial und Korsmeyer, 2004), sondern über TRADD (Aggarwal, 2003; Wajant *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu Fas und TRAIL-R1 konnte allerdings bisher durch Immunpräzipitation die Rekrutierung des DISC für den TNF-R1 unter physiologischen Bedingungen nicht nachgewiesen werden (Micheau und Tschopp, 2003; Harper *et al.*, 2003).

Arbeiten von Schütze *et al.* zur Aufklärung der TNF-R1-Signaltransduktion zeigten zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen der Internalisierung des TNF-R1 und der Induktion von Apoptose durch TNF (Schütze *et al.*, 1999). In weiteren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine Domäne im zytoplasmatischen Teil des TNF-R1 gefunden werden, die für die



Internalisierung des TNF-R1 essentiell ist. Diese *TNF-R1 internalization domain* (TRID) enthält das kanonische Internalisierungsmotiv YXXΦ. In der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst durch einen genetischen Ansatz geklärt werden, ob das Motiv YXXΦ auch für die Internalisierung des TNF-R1 verantwortlich ist. Weiterhin sollten mit Hilfe eines neuen methodischen Ansatzes immunomagnetisch markierte TNF-R1-Fraktionen analysiert werden, um die Rekrutierung des DISC unter physiologischen Bedingungen nachzuweisen. Schließlich sollte geprüft werden, ob DISC-Rekrutierung und Apoptoseinduktion von der Internalisierung des TNF-R1 abhängen.

#### **5.1.1 TNF-R1/TNF-R2-defiziente Mausfibroblasten mit rekonstituierten TNF-R1-Konstrukten als Zellsystem**

Zur Charakterisierung der TNF-vermittelten Apoptose mussten Zellen ohne endogenen TNF-R1 benutzt werden. Daher wurden Fibroblasten aus Oberschenkelknochen TNF-R1/TNF-R2-defizienter Mäuse stabil mit verschiedenen Mutanten des TNF-R1 retroviral transduziert. Retrovirale Vektoren im Allgemeinen und das in dieser Arbeit verwendete pCL-Vektorsystem im Speziellen sind geeignete Hilfsmittel, um Fremd-cDNA stabil in das Genom von Zellen zu integrieren und die in der Fremd-cDNA kodierten Proteine zu exprimieren (Naviaux und Verma, 1992; Naviaux *et al.*, 1996). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen in Abb. 5 zeigen, dass die cDNA des TNF-R1 erfolgreich in die Zellen transduziert worden war und der TNF-R1 zellmembranständig exprimiert wurde.

#### **5.1.2 Die Aminosäuresequenz YQRW innerhalb der TRID vermittelt die Internalisierung des TNF-R1.**

Der TNF-R1 wird konstitutiv auf der Oberfläche fast aller bekannten Zelltypen des Menschen exprimiert (Idriss und Naismith, 2000) und liegt dort aufgrund der Wechselwirkung einer Domäne mit der Bezeichnung PLAD (*preligand assembly domain*) als Homomultimer vor (Chan *et al.*, 2000). Nach Ligandenbindung wird der TNF-R1 endozytotisch in die Zelle aufgenommen (Kuriyama *et al.*, 1988).

Experimente in unserer Arbeitsgruppe führten zur Identifizierung einer Region des humanen TNF-R1, die für dessen Internalisierung benötigt wird. Dieser als TRID bezeichnete Bereich umfasst die zehn Aminosäuren 213-222 des TNF-R1 und liegt direkt C-terminal im Anschluss an die Transmembrandomäne. Vergleicht man diesen Bereich mit Internalisierungsdomänen anderer Rezeptoren, stellt man fest, dass er die Aminosäurefolge YQRW enthält, die dem weit verbreiteten tyrosinbasierten Internalisierungsmotiv YXX $\Phi$  entspricht. X steht hierbei für eine beliebige Aminosäure und  $\Phi$  für eine mit einem großen hydrophoben Rest. Gut untersuchte Beispiele für Rezeptoren, die YXX $\Phi$ -vermittelt internalisieren, sind der Transferrinrezeptor (Collawn *et al.*, 1990; Collawn *et al.*, 1993) und der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Canfield *et al.*, 1991). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit durch einen genetischen Ansatz überprüft werden, ob auch der TNF-R1 über das Motiv YXX $\Phi$  internalisiert.

Dabei wurde die Endozytose des TNF-R1 in TNF-R1/TNF-R2-defizienten Mausfibroblasten, die verschiedene Mutanten des TNF-R1 stabil exprimierten, mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Die in Abb. 6 dargestellten Aufnahmen zeigen zunächst, dass eine Deletion der TRID zu einem vollständigen Ausbleiben der Internalisierung führt und bestätigen damit die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe. Derselbe Effekt wird durch den Austausch lediglich einer Aminosäure erreicht, nämlich durch den von Tryptophan im Internalisierungsmotiv YQRW gegen Alanin. Damit bestätigt sich die Annahme, dass das kanonische Internalisierungsmotiv YXX $\Phi$  auch für die Endozytose des TNF-R1 verantwortlich ist. Dies wird durch einen weiteren Umstand untermauert:

Zellmembranrezeptoren, deren Internalisierung die Sequenz YXX $\Phi$  benötigt, werden clathrinvermittelt endozytiert (Marsh und McMahon, 1999). Folglich lässt eine YXX $\Phi$ -abhängige Internalisierung des TNF-R1 auch eine Endozytose als clathrinumhülltes Vesikel erwarten. Tatsächlich findet man Clathrin nach TNF-Stimulation in isolierten Zellfraktionen, die den TNF-R1 enthalten (Schneider-Brachert *et al.*, 2004). Im zeitlichen Verlauf nimmt die Menge an Clathrin in isolierten TNF-R1-Fraktionen zunächst zu, um danach wieder

abzufallen. Dies gibt den typischen Ablauf einer clathrinabhängigen Endozytose wieder: Clathrin akkumuliert an der Zellmembran, um eine Käfigstruktur um das entstehende Vesikel zu bilden. Später muss der Clathrinkäfig wieder entfernt werden (*uncoating*), damit das Vesikel mit einem anderen Zellkompartiment fusionieren kann (Marsh und McMahon, 1999; Kirchhausen, 2000). Dieser Ablauf konnte bei internalisierungsdefizienten TNF-R1-Konstrukten nicht beobachtet werden. Hier fand man in isolierten TNF-R1-Fraktionen im zeitlichen Verlauf nur die Akkumulation von Clathrin, eine Abnahme der Clathrinmenge wurde nicht festgestellt (Schneider-Brachert *et al.*, 2004).

Weiterhin demonstrieren die in Abb. 6 dargestellten Aufnahmen, dass der TNF-R1 außer der TRID keine weitere Region besitzt, die eine Endozytose ermöglicht. Dies ist nicht selbstverständlich, da man Rezeptoren kennt, die mehrere Erkennungsmotive für die Endozytosemaschinerie besitzen. So enthält etwa der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor zwei Internalisierungsmotive, die benötigt werden, um eine vollständige Rezeptorendozytose zu gewährleisten (Johnson *et al.*, 1990), während der EGF-Rezeptor hierfür sogar über drei Motive verfügt (Chang *et al.*, 1993). Demgegenüber besitzt der Transferrinrezeptor wie der TNF-R1 nur eine tyrosinbasierte Sequenz, deren Ausfall zu einer vollständigen Internalisierungsblockierung führt (Collawn *et al.*, 1990). Die Blockierung der TNF-R1-Internalisierung durch Austausch von Tyrosin gegen Alanin zeigt, dass Tyrosin für die Funktion des Motivs essentiell ist. Da Alanin im Gegensatz zu Tyrosin als Aminosäurerest lediglich ein Wasserstoffatom besitzt, ist es nicht verwunderlich, dass es Tyrosin in biochemischen Reaktionen nicht ersetzen kann. Es ist darüber hinaus aber sehr wahrscheinlich, dass Tyrosin innerhalb des Motivs YXX $\Phi$  durch gar keine andere Aminosäure ersetzt werden kann. Dafür sprechen Experimente mit dem Todesrezeptor Fas. Dieser wird ebenfalls über YXX $\Phi$  internalisiert. Hier führt bereits der Austausch von Tyrosin gegen das chemisch sehr ähnliche Phenylalanin zur Blockierung der Rezeptorendozytose (Lee *et al.*, 2006).

Neben der Funktion als Erkennungsmotiv für die Endozytosemaschinerie könnte die Sequenz YXX $\Phi$  auch für den intrazellulären Transport des TNF-R1

wichtig sein. Generell weiß man, dass YXXΦ oft für das Dirigieren von internalisierten Rezeptoren verantwortlich ist (Bonifacino und Traub, 2003). Am G Protein-gekoppelten Rezeptor konnte gezeigt werden, dass sein YXXΦ-Motiv sowohl für die Internalisierung als auch für den lysosomalen Transport notwendig ist (Paing *et al.*, 2004). Dies könnte auch für das YXXΦ-Motiv des TNF-R1 zutreffend sein, da er nach Internalisierung ebenfalls im Lysosom degradiert wird (Kuriyama *et al.*, 1988).

Obwohl YXXΦ für die Internalisierung des TNF-R1 absolut notwendig ist, kann die Beteiligung anderer Regionen des TNF-R1 für dessen Internalisierung nicht ausgeschlossen werden. So kennt man mit dem Protein Grb2 einen Interaktionspartner des TNF-R1 (Hildt und Oess, 1999), dessen Beteiligung an der Internalisierung von Zellmembranrezeptoren seit einiger Zeit diskutiert wird. Eine essentielle Funktion von Grb2 für die Rezeptorendozytose konnte sowohl für den Lymphozytenrezeptor CD229 als auch für den EGF-Rezeptor nachgewiesen werden (Jiang *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005). Bei Letztgenanntem scheint Grb2 für die Rekrutierung des Rezeptors zu *clathrin-coated pits* eine entscheidende Rolle zu spielen. Grb2 kannte man bis dahin als einen Bindungspartner von SOS, der wiederum essentiell für die Aktivierung der Kinase Ras ist (Bonfini *et al.*, 1992; Bowtell *et al.*, 1992; Corbalan-Garcia *et al.*, 1996). Ras steht am Beginn einer hierarchischen Kinasekaskade, an deren Ende mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen), wie ERK, aktiviert werden (Cano und Mahadevan, 1995). Grb2 ist offensichtlich auch für die Aktivierung von Ras und MAP-Kinasen durch den TNF-R1 verantwortlich (Hildt und Oess, 1999). Darüber hinaus könnte Grb2 ähnlich wie bei CD229 und beim EGF-Rezeptor auch eine Funktion für die clathrinvermittelte Internalisierung des TNF-R1 zukommen oder, wie beim EGF-Rezeptor ebenfalls vermutet, könnte die Aktivierung von Ras für die von Rab5a wichtig sein (Barbieri *et al.*, 2000). Rab Proteine, wie Rab5a, sind kleine GTPasen, denen verschiedene Aufgaben beim intrazellulären Transport von Zellkompartimenten, wie Vesikeln und Endosomen, zukommen (Zerial und McBride, 2001). Ob und welche Funktion Grb2 in der TNF-R1-Internalisierung besitzt, können aber nur weitergehende Untersuchungen klären.

Ein Merkmal vieler Membranproteine ist ihre Lokalisation in distinkten Bereichen der Zellmembran, die als *lipid rafts* bezeichnet werden (Pike, 2004). Diese Mikrodomänen setzen sich aus besonderen Fettverbindungen, vor allem Sphingomyelinen und Cholesterol, zusammen und sind äußerst inert gegenüber Detergenzien (Schroeder *et al.*, 1998). Sie stellen eine Kompartimentierung der Zellmembran dar, die eine regulative Funktion besitzen könnte. So wäre denkbar, dass nur unter bestimmten Bedingungen eine Translokation von Membranproteinen zu ihren spezifischen Interaktionspartnern in *lipid rafts* stattfindet (Anderson und Jacobson, 2002). Für den Todesrezeptor Fas z.B. ist eine Lokalisation in ceramidreichen Domänen beschrieben, um Apoptose induzieren zu können (Grassme *et al.*, 2001). Der Aufenthalt von Proteinen in derartigen Mikrodomänen lässt außerdem eine clathrinunabhängige Internalisierung via *caveolae* zu (Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001; Kirkham und Parton, 2005). Auch der TNF-R1 wurde in *lipid rafts* nachgewiesen, wobei hierfür das Vorhandensein der Todesdomäne entscheidend zu sein scheint (Cottin *et al.*, 2002). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch der TNF-R1 alternativ mittels *caveolae* internalisiert. Jedoch zeigten Analysen TNF-R1-beladener Vesikel ausschließlich die Anwesenheit von Clathrin. Verbindungen wie Caveolin-1, die typische Bestandteile von *caveolae* sind (Rothberg *et al.*, 1992; Stan, 2005), konnten dagegen nicht nachgewiesen werden (Schneider-Brachert *et al.*, 2004). Somit ist eine clathrinunabhängige Internalisierung des TNF-R1 unwahrscheinlich.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit die Aminosäuresequenz YXX $\Phi$  als das für die TNF-R1-Internalisierung verantwortliche Motiv identifiziert. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die TNF-R1-Internalisierung ausschließlich über dieses Motiv abläuft. Von großer Bedeutung für die Funktion des Motivs ist Tyrosin, da sein Austausch gegen Alanin zu einer vollständigen TNF-R1-Internalisierungsblockierung führte. Weiterhin sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Studien dafür, dass der TNF-R1 clathrinabhängig internalisiert.

### 5.1.3 Apoptoseinduktion durch TNF ist nur bei einer Internalisierung des TNF-R1 möglich

Nachdem man beobachtet hatte, dass der TNF-R1 nach Ligandenbindung internalisiert (Kuriyama *et al.*, 1988), war zunächst nicht klar, welche Funktion diesem Prozess zukommt. Die Internalisierung von Zellmembranrezeptoren ist ein häufig beobachtetes Phänomen, vor allem bei Rezeptoren, die Peptidhormone, Wachstumsfaktoren oder Interferone binden (Haigler *et al.*, 1980; Anderson *et al.*, 1983; Costlow und Hamble, 1982). Oft hat die Internalisierung des Rezeptors eine regulative Funktion. Entweder soll er durch einen Abbau im Lysosom überhaupt nicht mehr oder erst nach einer bestimmten Zeit durch Rücktransport an die Zelloberfläche für eine erneute Aktivierung zur Verfügung stehen (Beguino *et al.*, 1984; Dale *et al.*, 2004; Goldstein *et al.*, 1979). Eine Internalisierung des TNF-R1 könnte also auf eine derartige regulative Funktion hinweisen. Erst die Arbeiten von Schütze *et al.* machten deutlich, dass die Internalisierung des TNF-R1 einen essentiellen Schritt in der Apoptoseinduktion durch TNF darstellt, indem sie zum ersten Mal zeigten, dass eine Internalisierungsblockierung durch pharmakologische Substanzen Zellen resistent gegenüber TNF-induzierter Apoptose werden ließ (Schütze *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Zusammenhang mittels eines genetischen Ansatzes näher untersucht werden. Der TNF-R1 vermittelt Apoptose durch Rekrutierung der Proteine TRADD, FADD und Caspase-8 zum *death inducing signaling complex* (DISC) (Boldin *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1996c). Da aber beim TNF-R1 bisher jeglicher Versuch fehlschlug, die Bindung des DISC an den TNF-R1 durch Immunpräzipitation unter physiologischen Bedingungen nachzuweisen (Harper *et al.*, 2003; Micheau und Tschopp, 2003), wurde in dieser Arbeit ein neues immunomagnetisches Verfahren zur Aufreinigung metallisch markierter Kompartimente eingesetzt, um mögliche Interaktionspartner des TNF-R1 nach dessen Internalisierung in Vesikeln analysieren zu können (Tchikov *et al.*, 2001). Die in Abb. 7 dargestellten Daten belegen zunächst, dass es im Fall des Wildtyprezeptors tatsächlich zur postulierten Rekrutierung aller drei Komponenten des DISC an den TNF-R1 kommt. Weiterhin konnte bestätigt

werden, dass die Rekrutierung des DISC an die Todesdomäne des TNF-R1 erfolgt, da ihre Deletion (TNF-R1  $\Delta$ DD) eine DISC-Rekrutierung verhindert. Soweit sind die initialen Schritte der TNF-R1-vermittelten Apoptose in Hinsicht auf Bildung des DISC mit denen der anderen bekannten Todesrezeptoren wie Fas und TRAIL-R1 identisch. Die Ergebnisse mit internalisierungsdefizienten Mutanten des TNF-R1 zeigen aber darüber hinaus, dass im Fall des TNF-R1 eine Blockierung der Internalisierung zu einem vollständigen Ausbleiben der DISC-Rekrutierung führt. Dies ist der Fall, wenn sowohl die gesamte TRID deletiert als auch das Internalisierungsmotiv YXX $\Phi$  mutiert wird, obwohl diese Rezeptoren den DISC aufgrund einer intakten Todesdomäne rekrutieren könnten. Dass ein Ausbleiben des DISC nicht nur durch Austausch von Tryptophan gegen Alanin, sondern auch durch den von Tyrosin gegen Alanin erreicht werden kann, zeigt die Notwendigkeit eines vollständigen Internalisierungsmotivs für die DISC-Rekrutierung.

Zellen mit einem internalisierungsdefizienten TNF-R1 reagierten entgegen der Erwartung stark sensitiv auf TNF (Abb. 8 und 9). Da aber die DISC-Rekrutierung in diesen Zellen ausblieb, musste die Apoptose DISC-unabhängig ausgelöst worden sein. Zudem musste die Apoptoseinduktion auf die speziellen Bedingungen der Verwendung mutierter TNF-Rezeptoren zurückzuführen sein, da eine pharmakologische Blockierung der TNF-R1-Internalisierung zur TNF-Resistenz führt (Schütze *et al.*, 1999). Der wahrscheinlichste Grund für die Apoptoseinduktion schien eine Aktivitätserhöhung der zellmembranständigen N-SMase zu sein, da dieses Enzym über die *neutral sphingomyelinase domain* (NSD) des TNF-R1 aktiviert wird (Adam *et al.*, 1996) und proapoptotische Ceramide erzeugt (Adam-Klages *et al.*, 1996; Jarvis *et al.*, 1994). Diese Hypothese wurde durch die gemessene hohe N-SMase-Aktivität in Zellen mit internalisierungsdefizienten TNF-Rezeptoren bestätigt (Abb. 12). Um eine Apoptoseinduktion durch die N-SMase ausschließen zu können, wurde daher ein internalisierungsdefizienter TNF-R1 kloniert, dem die Domäne zur Aktivierung der N-SMase fehlte (TNF-R1  $\Delta$ TRID  $\Delta$ NSD). Zellen mit diesem TNF-R1 waren TNF-resistent (Abb. 11). Dieses Ergebnis lässt zwei Aussagen zu: Erstens ist für die DISC-induzierte Apoptose die Internalisierung des

TNF-R1 unabdingbar. Zweitens wird die Vermutung bestätigt, dass Zellen mit einem internalisierungsdefizienten TNF-R1 aufgrund einer stark erhöhten N-SMase-Aktivität TNF-sensitiv sind. Weitergehende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass für die Apoptoseinduktion durch die N-SMase nicht nur ein mutierter TNF-R1 verantwortlich ist, sondern auch der gleichzeitige Einsatz eines Proteinbiosynthesehemmers. Werden Zellen mit einem internalisierungsdefizienten TNF-R1 über 24h allein mit TNF behandelt, so reagieren sie nicht apoptotisch. In Zellen mit einem Wildtyp-Rezeptor hingegen wird unter diesen Versuchsbedingungen Apoptose induziert (Schneider-Brachert *et al.*, 2004).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal unter physiologischen Bedingungen sowohl die Rekrutierung des DISC an den TNF-R1 als auch die Notwendigkeit der YXX $\Phi$ -vermittelten Internalisierung des TNF-R1 für die DISC-abhängige Apoptose gezeigt. Weiterhin wurde eine bis dahin unbekannte DISC-unabhängige Apoptoseinduktion gefunden, die auf einer stark erhöhten N-SMase-Aktivität beruht. Voraussetzung hierfür sind die Internalisierungsdefizienz des TNF-R1 und die Suszeptibilität der Zellen für TNF durch einen Proteinsynthesehemmer.

Durch weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte ein Modell der TNF-R1-Signaltransduktion erstellt werden (Abb. 22, S.98) (Schneider-Brachert *et al.*, 2004; Neumeyer *et al.*, 2006). Nach Aktivierung internalisiert der TNF-R1 und rekrutiert an die Todesdomäne den DISC aus TRADD, FADD und Caspase-8. Dabei wird Caspase-8 aktiviert und induziert Apoptose über Aktivierung von Caspase-3. Für die Aktivierung von Caspase-3 gibt es drei Möglichkeiten. Die erste besteht in einer direkten Aktivierung durch Caspase-8 (Scaffidi *et al.*, 1999). Die zweite Möglichkeit besteht in einer Aktivierung von Bid durch Caspase-8 und Induktion der mitochondrienabhängigen Apoptose, wobei Caspase-3 durch Caspase-9 aktiviert wird (Li *et al.*, 1998a). Schließlich kann Caspase-8 auch das Enzym Saure Sphingomyelinase (A-SMase) aktivieren. Hierzu kommt es, wenn TNF-R1-beladene Vesikel mit solchen des *trans*-Golgi-Netzwerks, welche A-SMase enthalten, zu *multivesicular bodies* (MVB) fusionieren (Schneider-Brachert *et al.*, 2004). Aktivierte A-SMase



erzeugt Ceramide, die wiederum als Kofaktor die Protease Cathepsin D aktivieren. Cathepsin D transloziert daraufhin ins Zytoplasma und spaltet Bid, welches die mitochondrienabhängige Apoptose induziert (Heinrich *et al.*, 2004). Aber unabhängig davon, auf welchem Weg Caspase-8 nach TNF-Stimulation Apoptose auslöst, ist zur ihrer Aktivierung die DISC-Rekrutierung und damit die Internalisierung des TNF-R1 notwendig (Schneider-Brachert *et al.*, 2004). Ohne Bildung des DISC kann TNF Apoptose durch eine starke Aktivierung der zellmembranständigen N-SMase auslösen. Hierzu sind aber ein internalisierungsdefizienter TNF-R1 und die Hemmung der Proteinbiosynthese nötig. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TNF verläuft im Gegensatz zur Apoptoseinduktion unabhängig von der TNF-R1-Internalisierung. Hierfür spricht, dass die Rekrutierung von RIP-1 und TRAF-2, welche zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B notwendig ist (Devin *et al.*, 2000), auch an internalisierungsdefizienten TNF-R1-Konstrukten beobachtbar ist (Schneider-Brachert *et al.*, 2004). Zudem benötigt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Translokation des TNF-R1 in *lipid rafts* (Legler *et al.*, 2003).

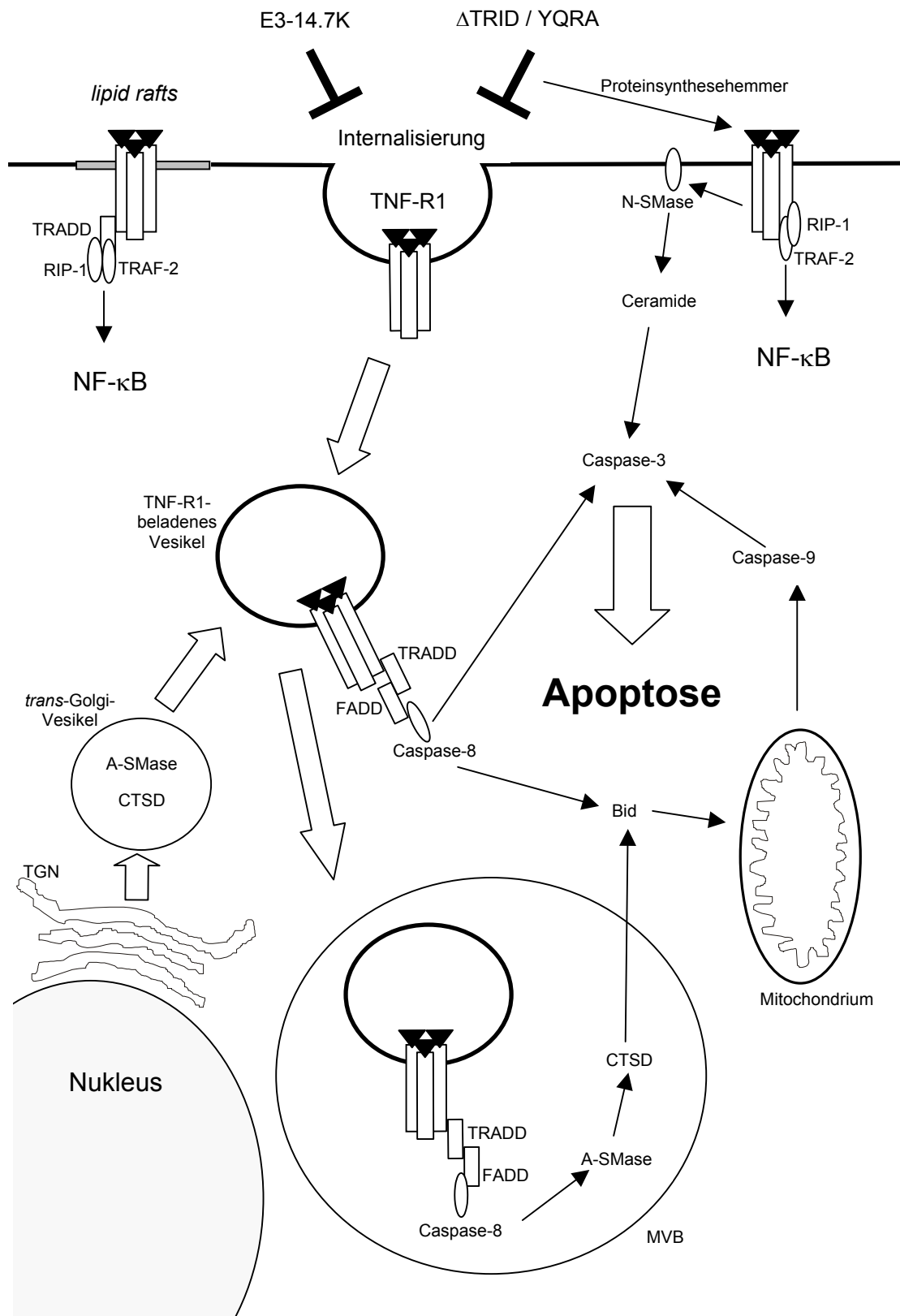


Abb.22

**Abb. 22 Modell der TNF-R1-Signaltransduktion**

Eine Internalisierung des TNF-R1 nach Stimulation mit TNF führt zur Rekrutierung von TRADD, FADD und Caspase-8. Caspase-8 aktiviert daraufhin Caspase-3 und es kommt zur Induktion von Apoptose. Caspase-8 kann aber auch Bid aktivieren, was zur Induktion der mitochondrienabhängigen Apoptose führt. Alternativ fusionieren TNF-R1-beladene Vesikel mit solchen des *trans*-Golgi Netzwerkes (TGN), die A-SMase und Cathepsin D (CTSD) enthalten, zu *multivesicular bodies* (MVB). Hierbei aktiviert Caspase-8 A-SMase und diese durch Ceramidproduktion Cathepsin D (CTSD). CTSD transloziert daraufhin ins Zytoplasma, wo es Bid aktiviert, welches die mitochondrienabhängige Apoptose einleitet. DISC-unabhängig kann Apoptose in Zellen mit internalisierungsdefizientem TNF-R1 nach Hemmung der Proteinbiosynthese durch eine starke Aktivierung der zellmembranständigen N-SMase induziert werden. Für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung mittels Rekrutierung von TRADD, RIP-1 und TRAF-2 ist der Aufenthalt des TNF-R1 in *lipid rafts* notwendig. Eine Blockierung der TNF-R1-Internalisierung lässt weiterhin die NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu, RIP-1 und TRAF-2 binden aber ohne TRADD an den TNF-R1. Die Expression des adenoviralen Proteins E3-14.7K führt zur TNF-Resistenz durch Blockierung der TNF-R1-Internalisierung (vgl. 5.2). (Schneider-Brachert *et al.*, 2004, Neumeyer *et al.* 2006, verändert)

2003 wurde von Micheau und Tschopp zum ersten Mal ein Modell zur Signaltransduktion des TNF-R1 vorgestellt, das sich von dem in dieser Arbeit beschriebenen wesentlich unterscheidet (Micheau und Tschopp, 2003). Die Autoren postulieren die Bildung zweier Proteinkomplexe nach Bindung von TNF an den TNF-R1. Ein zellmembranständiger Komplex I, bestehend aus TNF-R1, TRADD, RIP-1 und TRAF-2, ist demnach zunächst für die rasche Aktivierung von NF- $\kappa$ B zuständig. Nach einer bestimmten Zeit lösen sich TRADD, RIP-1 und TRAF-2 vom TNF-R1 und assoziieren im Zytoplasma mit FADD und Caspase-8 zum Apoptose induzierenden Komplex II. Mit der Annahme eines TNF-R1-unabhängigen Komplexes aus TRADD, FADD und Caspase-8 wird begründet, warum es zuvor, wie etwa bei Fas, nicht möglich war, ihn zusammen mit dem TNF-R1 zu immunpräzipitieren. Ihre Befunde erhalten Micheau und Tschopp aber durch einen völlig anderen methodischen Ansatz als durch den, welcher in der vorliegenden Arbeit gewählt wurde. In den Experimenten von Micheau und Tschopp wurden vollständige Zelllysate, die durch den Einsatz des starken Detergenz Nonidet-P40 gewonnen wurden, untersucht. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden isolierte TNF-R1-haltige Vesikel nach mechanischer Homogenisierung der Zellen analysiert. Unter der Voraussetzung, dass die DISC-Rekrutierung an den TNF-R1 im Vergleich zu der an andere Rezeptoren, wie Fas, relativ instabil ist (Wajant *et al.*, 2003), verwundert es nicht, warum Micheau und Tschopp unter den von

ihnen gewählten Lysebedingungen den DISC nicht an den TNF-R1 gebunden nachweisen können. Dies gelang erst, nachdem in der vorliegenden Arbeit unter schonenden Bedingungen TNF-R1-haltige Zellfraktionen isoliert werden konnten. Weiterhin erklärt das Modell von Micheau und Tschopp nicht, warum bei einer Internalisierungsblockierung des TNF-R1 durch pharmakologische Reagenzien in Zellen keine Apoptose mehr ausgelöst werden kann (Schütze *et al.*, 1999). Hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit durch einen genetischen Ansatz belegt werden, dass zur Apoptoseinduktion eine TNF-R1-Internalisierung notwendig ist. Vor allem aber spricht für das hier vorgestellte Modell, dass inzwischen auch für Fas eine Abhängigkeit der Apoptoseinduktion von der Internalisierung des Rezeptors in Typ I-Zellen gezeigt werden konnte (Lee *et al.*, 2006). Für die Apoptoseinduktion durch FasL in Typ I-Zellen ist eine sehr schnelle Internalisierung von Fas und die Bildung großer DISC-Mengen charakteristisch (Barnhart *et al.*, 2003). Fas besitzt ebenso wie der TNF-R1 das Internalisierungsmotiv YXX $\Phi$  (Lee *et al.*, 2006). In den Studien von Lee *et al.* wurde auf unterschiedliche Weise die Fas-Internalisierung blockiert, durch Hydrolyse von PIP<sub>2</sub>, Verwendung von AP-2- und CHC-spezifischer siRNA oder, wie in der vorliegenden Arbeit die Internalisierung des TNF-R1, durch Mutation des Motivs YXX $\Phi$ . Alle drei experimentellen Ansätze konnten klar zeigen, dass die Internalisierung von Fas essentiell ist, um die DISC-Mengen zu bilden, die für eine ausreichende Aktivierung von Caspase-8- und -3 und damit für die Apoptoseinduktion nötig sind. Für die Bereitstellung der entsprechenden Mengen an Adapterproteinen sind offensichtlich die Internalisierung von Fas und die anschließende Fusion des Vesikels mit frühen Endosomen entscheidend. Ohne Fas-Internalisierung liegt FADD diffus verteilt im Zytoplasma vor. Die Internalisierung von Fas führt zu einer Konzentration von FADD in frühen Endosomen, so dass nach der Fusion der Kompartimente genügend Adaptermoleküle für den DISC-Aufbau vorhanden sind. Lee *et al.* postulieren, dass der intrazelluläre Transport des aktiven DISC darüber hinaus für die Aktivierung nachgeschalteter Effektormoleküle wichtig ist, da frühere Studien zeigten, dass an der Zellmembran befindliche aktive Caspase-8 keine Apoptose auslöst (Martin *et al.*, 1998). Weiterhin konnten Lee *et al.* feststellen, dass die

Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der MAP-Kinase Erk nach Stimulation mit FasL unabhängig von der Internalisierung von Fas ist. Fas und der TNF-R1 weisen also sehr große Ähnlichkeiten in den Mechanismen der Signalweitergabe auf. Für beide Rezeptoren ist die Internalisierung eine essentielle Voraussetzung für die Rekrutierung des DISC und die Induktion von Apoptose. Für beide apoptotische Signalkaskaden spielt der intrazelluläre Transport des aktivierten Rezeptorkomplexes eine wichtige Rolle. Die Weitergabe nicht apoptotischer und antiapoptotischer Signale hingegen ist bei beiden Rezeptoren internalisierungsunabhängig. Somit scheint die subzelluläre Lokalisation des jeweiligen Rezeptors entscheidend für Überleben oder Tod der Zelle zu sein. Es könnte sich hierbei um einen Mechanismus handeln, der unter Todesrezeptoren weit verbreitet ist. Ein besseres Verständnis der daran beteiligten Prozesse könnte neue Ansätze zur Therapie von Krankheiten liefern, wenn es z.B. darum geht, in Zellen gezielt Apoptose auszulösen oder zu unterdrücken.

## 5.2 Verhinderung der TNF-induzierten Apoptose durch E3-14.7K

Im Laufe der Evolution haben Viren diverse Mechanismen sowohl gegen die angeborene als auch die adaptive Immunantwort des Wirts entwickelt. So ist das adenovirale Protein E3-14.7K in der Lage, die TNF-induzierte Apoptose in murinen Zellen zu unterdrücken (Horton *et al.*, 1991). Die Frage nach dem Mechanismus der E3-14.7K-vermittelten TNF-Resistenz blieb aber bisher noch unbeantwortet. Zudem wurde bisher noch kein direkter Beweis erbracht, dass E3-14.7K auch humane Zellen vor TNF schützt. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Expression von E3-14.7K in Mauszellen durch eine Blockierung der TNF-R1-Internalisierung und der DISC-Rekrutierung zur TNF-Resistenz führt. Davon ausgehend wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, ob E3-14.7K durch den gleichen Mechanismus auch humane Zellen vor Apoptose schützen kann. Dabei wurden sowohl E3-14.7K-transduzierte als auch adenovirusinfizierte Zellen untersucht.

Es zeigte sich, dass die TNF-R1-Internalisierung in E3-14.7K-Zellen vollständig blockiert war (Abb. 14). Da die Internalisierung des TNF-R1 eine unabdingbare Voraussetzung für die apoptotische Signaltransduktion des TNF-R1 darstellt, sollten in E3-14.7K-Zellen die Rekrutierung des DISC an den TNF-R1 und die Induktion von Apoptose nach Stimulation mit TNF ausbleiben. Dies konnte durch die Analyse isolierter TNF-Vesikel (Abb. 15) und TNF-Zytotoxizitätstests (Abb. 16) belegt werden. Damit wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass die Expression von E3-14.7K unabhängig von anderen adenoviralen Proteinen in humanen Zellen zur Blockierung der TNF-R1-Internalisierung und dadurch zur TNF-Resistenz führt.

Zur Bestätigung der physiologischen Relevanz dieses Ergebnisses wurden die Internalisierung des TNF-R1, DISC-Bildung und Apoptoseinduktion in adenovirusinfizierten humanen Zellen untersucht. In Ad5 WT-infizierten Zellen war die Internalisierung des TNF-R1 vollständig blockiert (Abb. 19), und die Rekrutierung sowohl von TRADD als auch von FADD und Caspase-8 blieb aus

(Abb. 20). Lediglich eine geringe Menge TRADD, die wahrscheinlich durch nicht infizierte Zellen verursacht wurde, konnte in den magnetisch isolierten Fraktionen gefunden werden. Weiterhin war TNF nicht in der Lage, Ad5 WT-infizierte Zellen allein oder bei gleichzeitiger Zugabe von CHX zu lysieren (Abb. 21). TNF-R1-Internalisierung, DISC-Rekrutierung und Induktion von Apoptose waren hingegen in Zellen, die mit Ad5 Viren ohne E3-Region oder mit einer funktionslosen E3-14.7K-Mutanten infiziert wurden, nicht inhibiert (Abb. 19, 20 und 21).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit folgt daher der Schluss, dass E3-14.7K in der Lage ist, aufgrund einer Blockierung der Internalisierung des TNF-R1 humane Zellen nach Infektion mit Adenoviren vor TNF zu schützen (vgl. Abb. 22). Dieses Ergebnis bestätigt die im ersten Teil der vorliegenden Arbeit durch Mutagenese des TNF-R1 gefundene Abhängigkeit der TNF-induzierten Apoptose von der Internalisierung des TNF-R1.

Verschiedene Studien berichten, dass TNF-Resistenz neben E3-14.7K auch durch andere E3-Proteine vermittelt werden kann. So soll die Minimierung der TNF-R1-Zelloberflächenexpression durch den aus E3-10.4K und E3-14.5K gebildeten Proteinkomplex RID eine Apoptoseinduktion durch TNF verhindern (Chin und Horwitz, 2006; Fessler *et al.*, 2004). Weiterhin wurde für E3-6.7K nach Transfektion von U937-Zellen gezeigt, dass es die TNF-induzierte Apoptose zwar nicht inhibiert, aber abschwächt (Moise *et al.*, 2002). Ein Einfluss von RID oder von E3-6.7K auf die TNF-induzierte Apoptose konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Bereits die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von adenovirusinfizierten Zellen, unabhängig davon, ob es sich dabei um Wildtypviren oder um Mutanten handelte, lieferten keine Hinweise auf eine verringerte Oberflächenexpression des TNF-R1 im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Insbesondere aber geht aus den Zytotoxizitätstest hervor, dass RID und E3-6.7K in Abwesenheit von E1B-19K und einem funktionsfähigen E3-14.7K Zellen nicht vor TNF-induzierter Apoptose schützen können. Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse könnte in unterschiedlichen methodischen Ansätzen liegen. Chin und Horwitz sowie

Fessler *et al.* verwendeten erstens keine Viren, sondern adenovirale Vektoren, denen die E1- und E3-Region fehlte, um RID in Zellen zu exprimieren und setzten außerdem MOIs ein, die die der vorliegenden Arbeit um Faktor 10 bis 50 übertrafen. In einer aktuellen Veröffentlichung der gleichen Arbeitsgruppe weisen die Autoren zudem selbst darauf hin, dass sie in Versuchen mit adenoviral infizierten 293-Zellen eine Abnahme der Zelloberflächenexpression des TNF-R1 von nur 17% feststellen konnten (Chin und Horwitz, 2006). Moise *et al.* benutzten ebenfalls keine Viren für ihre Studien, sondern exprimierten E3-6.7K in Abwesenheit aller anderen adenoviralen Proteine. So wäre es denkbar, dass entweder RID und E3-6.7K unter Infektionsbedingungen zumindest für die TNF-induzierte Apoptose keine entscheidende Rolle spielen oder nur dann, wenn sie in Zellen stark überexprimiert werden, also einen von der Dosis abhängigen Effekt besitzen, der bei moderater Expression nicht protektiv ist.

Seit der ersten Veröffentlichung zur E3-14.7K-vermittelten Apoptoseinhibierung wurde versucht, zelluläre Proteine zu identifizieren, mit denen 14.7K interagiert und die Aufschluss über die Prozesse geben können, in die 14.7K eingreift. So veröffentlichten Chen *et al.* Ergebnisse, denen zufolge bei der FasL-induzierten Apoptose die Aktivierung von Caspase-8 durch E3-14.7K inhibiert wird (Chen *et al.*, 1998). Allerdings sind diese Ergebnisse umstritten, da sie weder in Hinsicht auf Inhibierung der FasL-induzierten Apoptose durch E3-14.7K noch in Hinsicht auf eine Interaktion von E3-14.7K mit Caspase-8 reproduziert werden konnten (Horwitz, 2001; Lukashok *et al.*, 2000; Tollefson *et al.*, 1998; Shisler *et al.*, 1997). Die Gruppe um Horwitz konnte hingegen mittels eines *two-hybrid* Ansatzes in Hefe durch *screening* einer cDNA-Bibliothek vier zelluläre Interaktionspartner von E3-14.7K bestimmen, welche die Bezeichnung FIP-1 bis FIP-4 tragen (Li *et al.*, 1997).

Bei FIP-1 handelt es sich um eine LMW (*low molecular weight*) GTPase, die auch den Namen RagA trägt (Schurmann *et al.*, 1995). RagA/FIP-1 scheint für den Transport von Makromolekülen zwischen Zytoplasma und Zellkern wichtig zu sein (Hirose *et al.*, 1998). FIP-1 bindet aber auch spezifisch an das Protein GIP-1 (Lukashok *et al.*, 2000), das identisch mit dem humanen TCTEL1 ist.



TCTEL1 stellt ein Homolog des murinen Tctex-1, einer der leichten Ketten des murinen zytoplasmatischen Dynein, dar. Damit ergibt sich eine Verbindung zwischen E3-14.7K und dem intrazellulären Transport von Makromolekülen und Organellen. Es wäre denkbar, dass E3-14.7K unter anderem auch den Endosomentransport beeinflusst, der z.B. für die Verschmelzung von frühen Endosomen und TNF-R1-beladenen Vesikeln nötig ist (Schneider-Brachert *et al.*, 2004). Allerdings ist es genauso möglich, dass die Interaktion mit FIP-1 den intrazellulären Transport von E3-14.7K z.B. zum aktivierten TNF-Rezeptor-Komplex gewährleistet oder eine völlig andere Funktion erfüllt.

FIP-2 besitzt außer zu FIP-3 keine signifikante Homologie zu bekannten Proteinen und ist für die Assoziation von Rab8 an Huntingtin verantwortlich (Hattula und Peranen, 2000). Huntingtin ist das Protein, welches in einer mutierten Form, bei der ein Polyglutaminabschnitt verlängert ist, die neurodegenerative Krankheit Chorea Huntington verursacht (Rubinsztein *et al.*, 1993). Von Huntingtin nimmt man an, dass es am Vesikeltransport und an sekretorischen Prozessen teilnimmt (Velier *et al.*, 1998). Ob und wie E3-14.7K durch Binden an FIP-2 die Interaktion von Rab8 mit Huntingtin und damit den intrazellulären Transport von Molekülen beeinflusst, ist bis dato aber völlig unklar.

Das Maushomolog von FIP-3 ist identisch mit NEMO bzw. IKK- $\gamma$  (Li *et al.*, 1999). IKK- $\gamma$  kennt man als Bestandteil des IKK-Komplexes, der durch Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B- $\alpha$  dessen Degradierung ermöglicht und damit NF- $\kappa$ B aktiviert (Karin und Ben Neriah, 2000; Rothwarf *et al.*, 1998). Dies bedeutet, dass FIP-3 aufgrund der NF- $\kappa$ B-Aktivierung als ein antiapoptotischer Faktor einzustufen wäre (Mason *et al.*, 2004; Delhalle *et al.*, 2004). Auf der anderen Seite führt Überexpression von FIP-3 zu einer Blockierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und zu einer Induktion von Apoptose, die in Anwesenheit von E3-14.7K reprimiert wird (Li *et al.*, 1999). Die Frage, wie diese gegensätzlichen Befunde zu bewerten sind und zusammen in ein Bild von der Funktion von FIP-3 passen und was dabei die Interaktion von FIP-3 mit E3-14.7K bewirkt, ist noch ungelöst. Dabei muss zudem noch beachtet werden,

dass E3-14.7K selektiv auf bestimmte Untereinheiten von NF- $\kappa$ B wirkt. So wird einerseits berichtet, dass E3-14.7K in Leberzellen die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und IL-12, blockiert, indem es die p50-Untereinheit daran hindert, an DNA zu binden (Carmody *et al.*, 2006). Dagegen inhibiert E3-14.7K nicht die Funktion der nach TNF-Stimulation aktiven p65-Untereinheit, da diese an den E3-Promotor bindet und die Expression von E3-Proteinen fördert (Korner *et al.*, 1992; Deryckere und Burgert, 1996). Ein Einsatz von p65 als Transkriptionsfaktor adenoviraler Proteine fügt sich sehr gut in das Modell einer E3-14.7K-vermittelten Inhibierung der TNF-induzierten Apoptose durch eine TNF-R1-Internalisierungsblockierung ein, da gerade die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ohne Internalisierung des TNF-R1 erfolgt (Schneider-Brachert *et al.*, 2004). E3-14.7K würde damit selektiv aufgrund einer Blockierung der TNF-R1-Internalisierung die Induktion von Apoptose durch TNF unterbinden, die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und somit die von p65 aber unbeeinflusst lassen, damit das Virus von dieser profitiert.

FIP-4 ist identisch mit AIF (*apoptosis inducing factor*), einem Protein, das beim intrinsischen Weg der Apoptose aus dem Mitochondrium entlassen wird und in den Kern wandert, um dort caspaseunabhängig Apoptose auszulösen (Horwitz, 2004; Cande *et al.*, 2004). Inwieweit AIF für die TNF-induzierte Apoptose aber überhaupt wichtig ist und wie E3-14.7K die Funktionen von AIF beeinflusst, muss noch geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es sich bei E3-14.7K um ein Protein handelt, das mehrere, evtl. voneinander völlig unabhängige Funktionen erfüllt. Weiterhin zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Studien an FIP-1 und FIP-2, dass E3-14.7K definitiv einen Einfluss auf Endozytose und intrazellulären Vesikeltransport ausübt. Hierfür spricht zudem die Beobachtung, dass E3-14.7K bei der Blockierung der TNF-Rezeptorendozytose sowohl Rab5 als auch Dynamin-2 daran hindert, an den aktivierten Rezeptorkomplex rekrutiert zu werden (Schneider-Brachert *et al.*, 2006). Während Rab5 wichtig für den vesikulären Transport auch von anderen Zellmembranrezeptoren, wie dem EGFR, ist (Barbieri *et al.*, 2000), werden Dynamin und seine Isoformen dazu benötigt, invaginierte Zellmembranbereiche zu einem Vesikel

abzuschnüren (Hill *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass E3-14.7K durch Interferieren mit dem intrazellulären Vesikeltransport die Wirtszelle und damit das Virus vor TNF-induzierter Apoptose schützt, bestätigt zudem das in der vorliegende Arbeit vorgestellte Modell zur TNF-R1-Signaltransduktion (Abb. 22).

In den vermutlich zahlreichen Funktionen von E3-14.7K könnte sich eine allgemeine Strategie von Viren widerspiegeln, auf vielfältige Weisen die Immunantwort zu unterdrücken. So blockiert E3-14.7K die Apoptoseinduktion durch TNF, während RID vor allem für die Inhibierung der FasL- und TRAIL-induzierten Apoptose wichtig ist. Mit der Expression von E1B-19K stellt das Virus sicher, dass Apoptose an einem zentralen Punkt, an dem viele der bisher bekannten Apoptosepfade zusammenlaufen, unterdrückt wird. Das ebenfalls in der E3-Region kodierte E3-gp19K verhindert die Beladung des MHC-I und sorgt für Schutz vor erworbener Immunität (Wold und Gooding, 1989). Dass die E3-Region, obwohl sie für die Replikation von Adenoviren unerheblich ist, dennoch hochkonserviert in allen Adenovirustypen gefunden wird (Horwitz, 2004), zeigt, wie hoch der Selektionsdruck auf sie sein muss und wie wichtig sie für die Phylogenie der Adenoviren ist. Ein größeres Verständnis der Funktion der E3- und anderer viraler Proteine könnte unser Wissen über grundlegende zelluläre Prozesse entscheidend vertiefen und neue Wege bei der Bekämpfung von Krankheiten, wie Krebs, eröffnen oder den Einsatz neuer Methoden, wie der Verwendung von viralen Vektoren zur Gentherapie, ermöglichen.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Funktion der TNF-R1-Internalisierung. Dazu sollte das für die Internalisierung notwendige Aminosäuremotiv identifiziert werden. In unserer Arbeitsgruppe konnte durch *in vitro*-Mutagenese eine zytoplasmatische Domäne des TNF-R1 gefunden werden, nach deren Deletion die Internalisierung des TNF-R1 blockiert ist. Dieser als TRID (*TNF-R1 internalization domain*) bezeichnete Bereich enthält das kanonische Internalisierungsmotiv YXXΦ. Um zu prüfen, ob YXXΦ für die Internalisierung des TNF-R1 verantwortlich ist, wurden TNF-R1-Konstrukte hergestellt, denen entweder die TRID fehlte oder deren YXXΦ-Motiv mutiert worden war. Anschließend wurden die TNF-R1-Konstrukte in TNF-R1/TNF-R2-defizienten Zellen stabil zur Expression gebracht. Die Mutation des YXXΦ-Motivs resultierte ebenso wie eine Deletion der gesamten TRID in einer vollständigen Blockierung der TNF-R1-Internalisierung. Diese Ergebnisse zeigten klar, dass YXXΦ das für die TNF-R1-Internalisierung essentielle Aminosäuremotiv darstellt.

Bisherige Studien zeigten, dass eine pharmakologische Blockierung der TNF-R1-Internalisierung die TNF-induzierte Apoptose inhibiert. Der TNF-R1 vermittelt Apoptose durch Rekrutierung eines DISC (*death inducing signaling complex*) aus den Proteinen TRADD, FADD und Caspase-8 an die intrazelluläre Todesdomäne. Mit Hilfe der hergestellten Zellen, die internalisierungsdefiziente TNF-Rezeptoren exprimierten, sollte der Einfluss der TNF-R1-Internalisierung auf die Bildung des DISC näher untersucht werden. Dabei stellte sich das Problem, dass in allen bisherigen Studien die DISC-Rekrutierung unter physiologischen Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte. Daher wurden in dieser Arbeit durch eine eigens hierfür entwickelte Apparatur immunomagnetische TNF-R1-Vesikel nach Stimulation mit TNF isoliert und analysiert. Durch diesen neuen methodischen Ansatz konnte zum ersten Mal die Rekrutierung des DISC an den TNF-R1 unter physiologischen Bedingungen bewiesen werden. Darüber hinaus wurde anhand der

internalisierungsdefizienten TNF-R1-Konstrukte gezeigt, dass die Blockierung der TNF-R1-Internalisierung zu einem Ausbleiben des DISC führt und damit die Voraussetzung zur Apoptoseinduktion verhindert. Es wurde jedoch festgestellt, dass Zellen mit internalisierungsdefizienten TNF-Rezeptoren auf TNF hypersensitiv reagieren. In den entsprechenden TNF-Zytotoxizitätstests waren die Zellen mit einem Proteinsynthesehemmer vorbehandelt worden. Parallel durchgeführte Versuche in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine TNF-R1-Internalisierungsdefizienz Zellen in Abwesenheit eines Proteinsynthesehemmers vor TNF schützt. Unter den Bedingungen der TNF-R1-Internalisierungsdefizienz und gleichzeitiger Verwendung eines Proteinsynthesehemmers war also Apoptoseinduktion trotz einer fehlenden DISC-Rekrutierung möglich. Am wahrscheinlichsten erschien eine Apoptoseinduktion durch eine erhöhte Aktivität des Enzyms N-SMase, da dieses durch den TNF-R1 aktiviert werden kann und proapoptotische Ceramide erzeugt. Diese Hypothese wurde durch die Feststellung einer hohen N-SMase-Aktivität in Zellen mit internalisierungsdefizienten TNF-Rezeptoren belegt. Daher wurde ein TNF-R1-Konstrukt hergestellt, das weder die TRID noch die Domäne zur N-SMase-Aktivierung besaß. Zellen mit diesem TNF-R1 waren gegenüber TNF resistent und zeigten eine geringe N-SMase-Aktivität. Somit konnte gezeigt werden, dass die TNF-R1-Internalisierung die Voraussetzung für die DISC-vermittelte Apoptose darstellt. Weiterhin wurde eine alternative Apoptoseinduktion durch Aktivierung der N-SMase gefunden, für die aber ein internalisierungsdefizienter TNF-R1 und die Verwendung eines Proteinsynthesehemmers Voraussetzung waren.

Nachdem gezeigt wurde, dass die TNF-R1-Internalisierung für die TNF-induzierte Apoptose essentiell ist, sollte untersucht werden, welche Rolle die TNF-R1-Internalisierung in der Zellbiologie spielen könnte. Das in der E3-Region des adenoviralen Genoms kodierte Protein E3-14.7K ist in Mauszellen ein Inhibitor der TNF-induzierten Apoptose. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Expression von E3-14.K in Mauszellen zur TNF-Resistenz aufgrund einer Blockierung der TNF-R1-Internalisierung und eines Ausbleibens der DISC-Rekrutierung führt. In der vorliegenden Arbeit

konnte demonstriert werden, dass in humane Zellen E3-14.7K ebenfalls TNF-Resistenz vermittelt und dies, wie in murinen Zellen, auf einer Blockierung der TNF-R1-Internalisierung beruht. Dieser Resistenzmechanismus wurde sowohl in E3-14.7K-transduzierten Zellen als auch unter den pathophysiologischen Bedingungen einer Virusinfektion gefunden. Weiterhin zeigten die Experimente mit infizierten Zellen entgegen bisherigen Studien, dass E3-14.7K als einziges E3-kodiertes Protein vor TNF-induzierter Apoptose schützt.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die YXX $\Phi$ -vermittelte TNF-R1-Internalisierung eine unabdingbare Voraussetzung für die TNF-induzierte Apoptose darstellt. Die TNF-R1-Internalisierung ist von physiologischer Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass ihre gezielte Blockierung durch E3-14.7K adenovirusinfizierte humane Zellen vor TNF schützt.

## 7 Literaturverzeichnis

**Adam,D., Wiegmann,K., Adam-Klages,S., Ruff,A. and Krönke,M.** (1996) *A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway.* J. Biol. Chem., 271, 14617-14622.

**Adam-Klages,S., Adam,D., Wiegmann,K., Struve,S., Kolanus,W., Schneider-Mergener,J. and Krönke,M.** (1996) *FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase.* Cell, 86, 937-947.

**Aggarwal,B.B.** (2003) *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword.* Nat. Rev. Immunol., 3, 745-756.

**Aggarwal,B.B., Kohr,W.J., Hass,P.E., Moffat,B., Spencer,S.A., Henzel,W.J., Bringman,T.S., Nedwin,G.E., Goeddel,D.V. and Harkins,R.N.** (1985) *Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization.* J. Biol. Chem., 260, 2345-2354.

**Anderson,P., Yip,Y.K. and Vilcek,J.** (1983) *Human interferon-gamma is internalized and degraded by cultured fibroblasts.* J. Biol. Chem., 258, 6497-6502.

**Anderson,R.G. and Jacobson,K.** (2002) *A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains.* Science, 296, 1821-1825.

**Anglade,P., Vyas,S., Javoy-Agid,F., Herrero,M.T., Michel,P.P., Marquez,J., Mouatt-Prigent,A., Ruberg,M., Hirsch,E.C. and Agid,Y.** (1997) *Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease.* Histol. Histopathol., 12, 25-31.

**Arch,R.H., Gedrich,R.W. and Thompson,C.B.** (1998) *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death.* Genes Dev., 12, 2821-2830.

**Baines,C.P., Kaiser,R.A., Purcell,N.H., Blair,N.S., Osinska,H., Hambleton,M.A., Brunskill,E.W., Sayen,M.R., Gottlieb,R.A., Dorn,G.W., Robbins,J. and Molkentin,J.D.** (2005) *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death.* Nature, 434, 658-662.

**Barbieri,M.A., Roberts,R.L., Gumusboga,A., Highfield,H., Alvarez-Dominguez,C., Wells,A. and Stahl,P.D.** (2000) *Epidermal growth factor and membrane trafficking. EGF receptor activation of endocytosis requires Rab5a.* J. Cell Biol., 151, 539-550.

**Barnhart,B.C., Alappat,E.C. and Peter,M.E.** (2003) *The CD95 type I/type II model*. Semin. Immunol., 15, 185-193.

**Baud,V. and Karin,M.** (2001) *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol., 11, 372-377.

**Beguino,L., Lyall,R.M., Willingham,M.C. and Pastan,I.** (1984) *Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 81, 2384-2388.

**Benedict,C.A., Norris,P.S., Prigozy,T.I., Bodmer,J.L., Mahr,J.A., Garnett,C.T., Martinon,F., Tschopp,J., Gooding,L.R. and Ware,C.F.** (2001) *Three adenovirus E3 proteins cooperate to evade apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2*. J. Biol. Chem., 276, 3270-3278.

**Bergelson,J.M., Cunningham,J.A., Droguett,G., Kurt-Jones,E.A., Krithivas,A., Hong,J.S., Horwitz,M.S., Crowell,R.L. and Finberg,R.W.** (1997) *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*. Science, 275, 1320-1323.

**Berk,A.J.** (2005) *Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus*. Oncogene, 24, 7673-7685.

**Beyaert,R., Cuenda,A., Vanden Berghe,W., Plaisance,S., Lee,J.C., Haegeman,G., Cohen,P. and Fiers,W.** (1996) *The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor*. EMBO J., 15, 1914-1923.

**Black,R.A., Rauch,C.T., Kozlosky,C.J., Peschon,J.J., Slack,J.L., Wolfson,M.F., Castner,B.J., Stocking,K.L., Reddy,P., Srinivasan,S., Nelson,N., Boiani,N., Schooley,K.A., Gerhart,M., Davis,R., Fitzner,J.N., Johnson,R.S., Paxton,R.J., March,C.J. and Cerretti,D.P.** (1997) *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 385, 729-733.

**Boldin,M.P., Goncharov,T.M., Goltsev,Y.V. and Wallach,D.** (1996) *Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death*. Cell, 85, 803-815.

**Bonfini,L., Karlovich,C.A., Dasgupta,C. and Banerjee,U.** (1992) *The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras*. Science, 255, 603-606.

**Bonifacino,J.S. and Traub,L.M.** (2003) *Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes*. Annu. Rev. Biochem., 72, 395-447.



- Bowtell,D., Fu,P., Simon,M. and Senior,P.** (1992) *Identification of murine homologues of the Drosophila son of sevenless gene: potential activators of ras*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 89, 6511-6515.
- Bruns,P.** (1868) *Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste*. Beitr. Klin. Chir., 3, 443-446.
- Burke,F., Naylor,M.S., Davies,B. and Balkwill,F.** (1993) *The cytokine wall chart*. Immunol. Today, 14, 165-170.
- Bursch,W.** (2001) *The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death*. Cell Death. Differ., 8, 569-581.
- Buss,R.R., Sun,W. and Oppenheim,R.W.** (2006) *Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development*. Annu. Rev. Neurosci., 29, 1-35.
- Cande,C., Vahsen,N., Kouranti,I., Schmitt,E., Daugas,E., Spahr,C., Luban,J., Kroemer,R.T., Giordanetto,F., Garrido,C., Penninger,J.M. and Kroemer,G.** (2004) *AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis*. Oncogene, 23, 1514-1521.
- Canfield,W.M., Johnson,K.F., Ye,R.D., Gregory,W. and Kornfeld,S.** (1991) *Localization of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail*. J. Biol. Chem., 266, 5682-5688.
- Cano,E. and Mahadevan,L.C.** (1995) *Parallel signal processing among mammalian MAPKs*. Trends Biochem. Sci., 20, 117-122.
- Caravokyri,C. and Leppard,K.N.** (1996) *Human adenovirus type 5 variants with sequence alterations flanking the E2A gene: effects on E2 expression and DNA replication*. Virus Genes, 12, 65-75.
- Carmody,R.J., Maguschak,K. and Chen,Y.H.** (2006) *A novel mechanism of nuclear factor-kappaB regulation by adenoviral protein 14.7K*. Immunology, 117, 188-195.
- Carson,S.D.** (2001) *Receptor for the group B coxsackieviruses and adenoviruses: CAR*. Rev. Med. Virol., 11, 219-226.
- Carswell,E.A., Old,L.J., Kassel,R.L., Green,S., Fiore,N. and Williamson,B.** (1975) *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 72, 3666-3670.

- Chan,F.K., Chun,H.J., Zheng,L., Siegel,R.M., Bui,K.L. and Lenardo,M.J.** (2000) *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. Science, 288, 2351-2354.
- Chang,C.P., Lazar,C.S., Walsh,B.J., Komuro,M., Collawn,J.F., Kuhn,L.A., Tainer,J.A., Trowbridge,I.S., Farquhar,M.G., Rosenfeld,M.G. and .** (1993) *Ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor is mediated by multiple endocytic codes analogous to the tyrosine motif found in constitutively internalized receptors*. J. Biol. Chem., 268, 19312-19320.
- Chang,L. and Karin,M.** (2001) *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 410, 37-40.
- Chappell,T.G., Welch,W.J., Schlossman,D.M., Palter,K.B., Schlesinger,M.J. and Rothman,J.E.** (1986) *Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins*. Cell, 45, 3-13.
- Chen,G. and Goeddel,D.V.** (2002) *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, 296, 1634-1635.
- Chen,L., Willis,S.N., Wei,A., Smith,B.J., Fletcher,J.I., Hinds,M.G., Colman,P.M., Day,C.L., Adams,J.M. and Huang,D.C.** (2005) *Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function*. Mol. Cell, 17, 393-403.
- Chen,P., Tian,J., Kovesdi,I. and Bruder,J.T.** (1998) *Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis*. J. Biol. Chem., 273, 5815-5820.
- Chin,Y.R. and Horwitz,M.S.** (2005) *Mechanism for removal of tumor necrosis factor receptor 1 from the cell surface by the adenovirus RIDalpha/beta complex*. J. Virol., 79, 13606-13617.
- Chin,Y.R. and Horwitz,M.S.** (2006) *Adenovirus RID complex enhances degradation of internalized tumour necrosis factor receptor 1 without affecting its rate of endocytosis*. J. Gen. Virol., 87, 3161-3167.
- Chinnaiyan,A.M., O'Rourke,K., Tewari,M. and Dixit,V.M.** (1995) *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. Cell, 81, 505-512.
- Clarke,P.G. and Clarke,S.** (1996) *Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena*. Anat. Embryol. (Berl), 193, 81-99.
- Cohen,C.J., Shieh,J.T., Pickles,R.J., Okegawa,T., Hsieh,J.T. and Bergelson,J.M.** (2001) *The coxsackievirus and adenovirus receptor is a*

*transmembrane component of the tight junction*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 98, 15191-15196.

**Cohen,G.M., Sun,X.M., Fearnhead,H., MacFarlane,M., Brown,D.G., Snowden,R.T. and Dinsdale,D.** (1994) *Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes*. J. Immunol., 153, 507-516.

**Coley,W.B.** (1891) *Contribution to the knowledge of Sarcoma*. Ann. Surg., 14, 199-220.

**Collawn,J.F., Lai,A., Domingo,D., Fitch,M., Hatton,S. and Trowbridge,I.S.** (1993) *YTRF is the conserved internalization signal of the transferrin receptor, and a second YTRF signal at position 31-34 enhances endocytosis*. J. Biol. Chem., 268, 21686-21692.

**Collawn,J.F., Stangel,M., Kuhn,L.A., Esekogwu,V., Jing,S.Q., Trowbridge,I.S. and Tainer,J.A.** (1990) *Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis*. Cell, 63, 1061-1072.

**Collins,B.M., McCoy,A.J., Kent,H.M., Evans,P.R. and Owen,D.J.** (2002) *Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex*. Cell, 109, 523-535.

**Conner,S.D. and Schmid,S.L.** (2002) *Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis*. J. Cell Biol., 156, 921-929.

**Conner,S.D. and Schmid,S.L.** (2003) *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, 422, 37-44.

**Corbalan-Garcia,S., Yang,S.S., Degenhardt,K.R. and Bar-Sagi,D.** (1996) *Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2*. Mol. Cell Biol., 16, 5674-5682.

**Cory,S. and Adams,J.M.** (2002) *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nat. Rev. Cancer, 2, 647-656.

**Costlow,M.E. and Hamble,A.** (1982) *Prolactin receptors in cultured rat mammary tumor cells. Energy-dependent uptake and degradation of hormone receptors*. J. Biol. Chem., 257, 9330-9334.

**Cottin,V., Doan,J.E. and Riches,D.W.** (2002) *Restricted localization of the TNF receptor CD120a to lipid rafts: a novel role for the death domain*. J. Immunol., 168, 4095-4102.

- Crowther,R.A. and Pearse,B.M.** (1981) *Assembly and packing of clathrin into coats.* J. Cell Biol., 91, 790-797.
- Dale,L.B., Seachrist,J.L., Babwah,A.V. and Ferguson,S.S.** (2004) *Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab5, Rab7, and Rab11 GTPases.* J. Biol. Chem., 279, 13110-13118.
- Danial,N.N. and Korsmeyer,S.J.** (2004) *Cell death: critical control points.* Cell, 116, 205-219.
- de la Monte,S.M., Sohn,Y.K., Ganju,N. and Wands,J.R.** (1998) *P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases.* Lab Invest, 78, 401-411.
- Delhalle,S., Blasius,R., Dicato,M. and Diederich,M.** (2004) *A beginner's guide to NF-kappaB signaling pathways.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1030, 1-13.
- Delhase,M., Hayakawa,M., Chen,Y. and Karin,M.** (1999) *Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation.* Science, 284, 309-313.
- Deryckere,F. and Burgert,H.G.** (1996) *Tumor necrosis factor alpha induces the adenovirus early 3 promoter by activation of NF-kappaB.* J. Biol. Chem., 271, 30249-30255.
- Devin,A., Cook,A., Lin,Y., Rodriguez,Y., Kelliher,M. and Liu,Z.** (2000) *The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation.* Immunity., 12, 419-429.
- Du,C., Fang,M., Li,Y., Li,L. and Wang,X.** (2000) *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.* Cell, 102, 33-42.
- Ehrenschwender,M.** (2006) *Charakterisierung des Internalisierungsmotivs des humanen Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1.* Dissertation, Regensburg.
- Enari,M., Sakahira,H., Yokoyama,H., Okawa,K., Iwamatsu,A. and Nagata,S.** (1998) *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.* Nature, 391, 43-50.
- Endres,R., Hacker,G., Brosch,I. and Pfeffer,K.** (2003) *Apparently normal tumor necrosis factor receptor 1 signaling in the absence of the silencer of death domains.* Mol. Cell Biol., 23, 6609-6617.
- Fadeel,B. and Orrenius,S.** (2005) *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease.* J. Intern. Med., 258, 479-517.

- Farber,E.** (1994) *Programmed cell death: necrosis versus apoptosis*. Mod. Pathol., 7, 605-609.
- Fas,S.C., Baumann,S., Zhu,J.Y., Giaisi,M., Treiber,M.K., Mahlknecht,U., Krammer,P.H. and Li-Weber,M.** (2006) *Wogonin sensitizes resistant malignant cells to TNF{alpha}- and TRAIL-induced apoptosis*. Blood.
- Feinberg,B., Kurzrock,R., Talpaz,M., Blick,M., Saks,S. and Gutterman,J.U.** (1988) *A phase I trial of intravenously-administered recombinant tumor necrosis factor-alpha in cancer patients*. J. Clin. Oncol., 6, 1328-1334.
- Fessler,S.P., Chin,Y.R. and Horwitz,M.S.** (2004) *Inhibition of tumor necrosis factor (TNF) signal transduction by the adenovirus group C RID complex involves downregulation of surface levels of TNF receptor 1*. J. Virol., 78, 13113-13121.
- Fessler,S.P. and Young,C.S.** (1998) *Control of adenovirus early gene expression during the late phase of infection*. J. Virol., 72, 4049-4056.
- Fiers,W.** (1991) *Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level*. FEBS Lett., 285, 199-212.
- Ford,M.G., Mills,I.G., Peter,B.J., Vallis,Y., Praefcke,G.J., Evans,P.R. and McMahon,H.T.** (2002) *Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin*. Nature, 419, 361-366.
- Ford,M.G., Pearce,B.M., Higgins,M.K., Vallis,Y., Owen,D.J., Gibson,A., Hopkins,C.R., Evans,P.R. and McMahon,H.T.** (2001) *Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes*. Science, 291, 1051-1055.
- Fulda,S. and Debatin,K.M.** (2004) *Apoptosis signaling in tumor therapy*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1028, 150-156.
- Gabler,S., Schutt,H., Groitl,P., Wolf,H., Shenk,T. and Dobner,T.** (1998) *E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs*. J. Virol., 72, 7960-7971.
- Gaidarov,I. and Keen,J.H.** (1999) *Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits*. J. Cell Biol., 146, 755-764.
- Gearing,A.J., Beckett,P., Christodoulou,M., Churchill,M., Clements,J., Davidson,A.H., Drummond,A.H., Galloway,W.A., Gilbert,R., Gordon,J.L. and .** (1994) *Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases*. Nature, 370, 555-557.

- Gerl,R. and Vaux,D.L.** (2005) *Apoptosis in the development and treatment of cancer*. Carcinogenesis, 26, 263-270.
- Goldstein,J.L., Anderson,R.G. and Brown,M.S.** (1979) *Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis*. Nature, 279, 679-685.
- Gooding,L.R., Aquino,L., Duerksen-Hughes,P.J., Day,D., Horton,T.M., Yei,S.P. and Wold,W.S.** (1991) *The E1B 19,000-molecular-weight protein of group C adenoviruses prevents tumor necrosis factor cytotoxicity of human cells but not of mouse cells*. J. Virol., 65, 3083-3094.
- Gooding,L.R., Elmore,L.W., Tollefson,A.E., Brady,H.A. and Wold,W.S.** (1988) *A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytotoxicity by tumor necrosis factor*. Cell, 53, 341-346.
- Gooding,L.R., Sofola,I.O., Tollefson,A.E., Duerksen-Hughes,P. and Wold,W.S.** (1990) *The adenovirus E3-14.7K protein is a general inhibitor of tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity*. J. Immunol., 145, 3080-3086.
- Gotoh,Y. and Cooper,J.A.** (1998) *Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor- $\alpha$  signal transduction*. J. Biol. Chem., 273, 17477-17482.
- Grassme,H., Jekle,A., Riehle,A., Schwarz,H., Berger,J., Sandhoff,K., Kolesnick,R. and Gulbins,E.** (2001) *CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts*. J. Biol. Chem., 276, 20589-20596.
- Greber,U.F.** (2002) *Signalling in viral entry*. Cell Mol. Life Sci., 59, 608-626.
- Grell,M., Douni,E., Wajant,H., Lohden,M., Clauss,M., Maxeiner,B., Georgopoulos,S., Lesslauer,W., Kollias,G., Pfizenmaier,K. and Scheurich,P.** (1995) *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 83, 793-802.
- Haigler,H.T., Maxfield,F.R., Willingham,M.C. and Pastan,I.** (1980) *Dansylcadaverine inhibits internalization of <sup>125</sup>I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells*. J. Biol. Chem., 255, 1239-1241.
- Hao,W., Luo,Z., Zheng,L., Prasad,K. and Lafer,E.M.** (1999) *AP180 and AP-2 interact directly in a complex that cooperatively assembles clathrin*. J. Biol. Chem., 274, 22785-22794.
- Harper,N., Hughes,M., MacFarlane,M. and Cohen,G.M.** (2003) *Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis*. J. Biol. Chem., 278, 25534-25541.

- Hattula,K. and Peranen,J.** (2000) *FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis.* Curr. Biol., 10, 1603-1606.
- Hehlgans,T. and Pfeffer,K.** (2005) *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games.* Immunology, 115, 1-20.
- Heinrich,M., Neumeyer,J., Jakob,M., Hallas,C., Tchikov,V., Winoto-Morbach,S., Wickel,M., Schneider-Brachert,W., Trauzold,A., Hethke,A. and Schütze,S.** (2004) *Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation.* Cell Death. Differ., 11, 550-563.
- Heinrich,M., Wickel,M., Schneider-Brachert,W., Sandberg,C., Gahr,J., Schwandner,R., Weber,T., Saftig,P., Peters,C., Brunner,J., Krönke,M. and Schütze,S.** (1999) *Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide.* EMBO J., 18, 5252-5263.
- Helton,E.S. and Chen,X.** (2006) *p53 modulation of the DNA damage response.* J. Cell Biochem.,
- Heuser,J.E. and Keen,J.** (1988) *Deep-etch visualization of proteins involved in clathrin assembly.* J. Cell Biol., 107, 877-886.
- Hildt,E. and Oess,S.** (1999) *Identification of Grb2 as a novel binding partner of tumor necrosis factor (TNF) receptor I.* J. Exp. Med., 189, 1707-1714.
- Hill,E., van Der,K.J., Downes,C.P. and Smythe,E.** (2001) *The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission.* J. Cell Biol., 152, 309-323.
- Hinshaw,J.E. and Schmid,S.L.** (1995) *Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding.* Nature, 374, 190-192.
- Hirata,H., Takahashi,A., Kobayashi,S., Yonehara,S., Sawai,H., Okazaki,T., Yamamoto,K. and Sasada,M.** (1998) *Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis.* J. Exp. Med., 187, 587-600.
- Hirose,E., Nakashima,N., Sekiguchi,T. and Nishimoto,T.** (1998) *RagA is a functional homologue of S. cerevisiae Gtr1p involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway.* J. Cell Sci., 111 ( Pt 1), 11-21.
- Hofmann,K. and Falquet,L.** (2001) *A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems.* Trends Biochem. Sci., 26, 347-350.

- Horton,T.M., Ranheim,T.S., Aquino,L., Kusher,D.I., Saha,S.K., Ware,C.F., Wold,W.S. and Gooding,L.R.** (1991) *Adenovirus E3 14.7K protein functions in the absence of other adenovirus proteins to protect transfected cells from tumor necrosis factor cytotoxicity*. J. Virol., 65, 2629-2639.
- Horton,T.M., Tollefson,A.E., Wold,W.S. and Gooding,L.R.** (1990) *A protein serologically and functionally related to the group C E3 14,700-kilodalton protein is found in multiple adenovirus serotypes*. J. Virol., 64, 1250-1255.
- Horwitz,M.S.** (2001) *Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets*. Virology, 279, 1-8.
- Horwitz,M.S.** (2004) *Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins*. J. Gene Med., 6 Suppl 1, S172-S183.
- Horwitz,M.S., Scharff,M.D. and Maizel,J.V., Jr.** (1969) *Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres, and morphogenesis of the virion*. Virology, 39, 682-694.
- Hsu,H., Huang,J., Shu,H.B., Baichwal,V. and Goeddel,D.V.** (1996a) *TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex*. Immunity., 4, 387-396.
- Hsu,H., Shu,H.B., Pan,M.G. and Goeddel,D.V.** (1996b) *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, 84, 299-308.
- Hsu,H., Shu,H.B., Pan,M.G. and Goeddel,D.V.** (1996c) *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, 84, 299-308.
- Hsu,H., Xiong,J. and Goeddel,D.V.** (1995) *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 81, 495-504.
- Hussain,S.P. and Harris,C.C.** (2006) *p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis*. J. Nippon Med. Sch, 73, 54-64.
- Idriss,H.T. and Naismith,J.H.** (2000) *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microsc. Res. Tech., 50, 184-195.
- Inoue,H., Nojima,H. and Okayama,H.** (1990) *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene, 96, 23-28.



**Ishizuya-Oka,A. and Shimozawa,A.** (1992) *Programmed cell death and heterolysis of larval epithelial cells by macrophage-like cells in the anuran small intestine in vivo and in vitro*. J. Morphol., 213, 185-195.

**Itoh,T., Koshiba,S., Kigawa,T., Kikuchi,A., Yokoyama,S. and Takenawa,T.** (2001) *Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis*. Science, 291, 1047-1051.

**Jacobson,M.D., Weil,M. and Raff,M.C.** (1997) *Programmed cell death in animal development*. Cell, 88, 347-354.

**Jarvis,W.D., Kolesnick,R.N., Fornari,F.A., Traylor,R.S., Gewirtz,D.A. and Grant,S.** (1994) *Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 91, 73-77.

**Jiang,R., Gao,B., Prasad,K., Greene,L.E. and Eisenberg,E.** (2000) *Hsc70 chaperones clathrin and primes it to interact with vesicle membranes*. J. Biol. Chem., 275, 8439-8447.

**Jiang,R.F., Greener,T., Barouch,W., Greene,L. and Eisenberg,E.** (1997) *Interaction of auxilin with the molecular chaperone, Hsc70*. J. Biol. Chem., 272, 6141-6145.

**Jiang,X., Huang,F., Marusyk,A. and Sorkin,A.** (2003) *Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits*. Mol. Biol. Cell, 14, 858-870.

**Jiang,Y., Woronicz,J.D., Liu,W. and Goeddel,D.V.** (1999) *Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains*. Science, 283, 543-546.

**Jin,A.J. and Nossal,R.** (1993) *Topological mechanisms involved in the formation of clathrin-coated vesicles*. Biophys. J., 65, 1523-1537.

**Johnson,K.F., Chan,W. and Kornfeld,S.** (1990) *Cation-dependent mannose 6-phosphate receptor contains two internalization signals in its cytoplasmic domain*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 87, 10010-10014.

**Kajstura,J., Cheng,W., Reiss,K., Clark,W.A., Sonnenblick,E.H., Krajewski,S., Reed,J.C., Olivetti,G. and Anversa,P.** (1996) *Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats*. Lab Invest, 74, 86-107.

**Karin,M. and Ben Neriah,Y.** (2000) *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity*. Annu. Rev. Immunol., 18, 621-663.

- Karin,M. and Lin,A.** (2002) *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat. Immunol., 3, 221-227.
- Kelkar,S.A., Pfister,K.K., Crystal,R.G. and Leopold,P.L.** (2004) *Cytoplasmic dynein mediates adenovirus binding to microtubules*. J. Virol., 78, 10122-10132.
- Kerr,J.F.** (1971) *Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death*. J. Pathol., 105, 13-20.
- Kerr,J.F., Wyllie,A.H. and Currie,A.R.** (1972) *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer, 26, 239-257.
- Kiang,J.G. and Tsokos,G.C.** (1998) *Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology*. Pharmacol. Ther., 80, 183-201.
- Kim,H.J. and Foster,M.P.** (2002) *Characterization of Ad5 E3-14.7K, an adenoviral inhibitor of apoptosis: structure, oligomeric state, and metal binding*. Protein Sci., 11, 1117-1128.
- Kirchhausen,T.** (1999) *Adaptors for clathrin-mediated traffic*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 15, 705-732.
- Kirchhausen,T.** (2000) *Clathrin*. Annu. Rev. Biochem., 69, 699-727.
- Kirchhausen,T. and Harrison,S.C.** (1981) *Protein organization in clathrin trimers*. Cell, 23, 755-761.
- Kirkham,M. and Parton,R.G.** (2005) *Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers*. Biochim. Biophys. Acta, 1745, 273-286.
- Kischkel,F.C., Hellbardt,S., Behrmann,I., Germer,M., Pawlita,M., Krammer,P.H. and Peter,M.E.** (1995) *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J., 14, 5579-5588.
- Korner,H., Fritzsche,U. and Burgert,H.G.** (1992) *Tumor necrosis factor alpha stimulates expression of adenovirus early region 3 proteins: implications for viral persistence*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 89, 11857-11861.
- Kothakota,S., Azuma,T., Reinhard,C., Klippel,A., Tang,J., Chu,K., McGarry,T.J., Kirschner,M.W., Koths,K., Kwiatkowski,D.J. and Williams,L.T.** (1997) *Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis*. Science, 278, 294-298.

**Kozlov,M.M.** (2001) *Fission of biological membranes: interplay between dynamin and lipids*. Traffic., 2, 51-65.

**Krajcsi,P., Dimitrov,T., Hermiston,T.W., Tollefson,A.E., Ranheim,T.S., Vande Pol,S.B., Stephenson,A.H. and Wold,W.S.** (1996) *The adenovirus E3-14.7K protein and the E3-10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid*. J. Virol., 70, 4904-4913.

**Krammer,P.H.** (2000) *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature, 407, 789-795.

**Kuriyama,H., Watanabe,N., Sone,H., Neda,H., Yamauchi,N., Maeda,M., Niitsu,Y. and Urushizaki,I.** (1988) *[Continuous internalization of TNF receptors in a human myosarcoma cell line]*. Gan To Kagaku Ryoho, 15, 325-333.

**Lee,E. and De Camilli,P.** (2002) *Dynamin at actin tails*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 99, 161-166.

**Lee,K.H., Feig,C., Tchikov,V., Schickel,R., Hallas,C., Schütze,S., Peter,M.E. and Chan,A.C.** (2006) *The role of receptor internalization in CD95 signaling*. EMBO J., 25, 1009-1023.

**Leen,A.M., Bollard,C.M., Myers,G.D. and Rooney,C.M.** (2006) *Adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation*. Biol. Blood Marrow Transplant., 12, 243-251.

**Legler,D.F., Micheau,O., Doucey,M.A., Tschopp,J. and Bron,C.** (2003) *Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation*. Immunity., 18, 655-664.

**Li,H., Zhu,H., Xu,C.J. and Yuan,J.** (1998b) *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 94, 491-501.

**Li,H., Zhu,H., Xu,C.J. and Yuan,J.** (1998a) *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 94, 491-501.

**Li,L.Y., Luo,X. and Wang,X.** (2001) *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature, 412, 95-99.

**Li,Y., Kang,J., Friedman,J., Tarassishin,L., Ye,J., Kovalenko,A., Wallach,D. and Horwitz,M.S.** (1999) *Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor*

*necrosis factor alpha-induced apoptosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 96, 1042-1047.

**Li,Y., Kang,J. and Horwitz,M.S.** (1997) *Interaction of an adenovirus 14.7-kilodalton protein inhibitor of tumor necrosis factor alpha cytotoxicity with a new member of the GTPase superfamily of signal transducers*. J. Virol., 71, 1576-1582.

**Li,Y., Kang,J. and Horwitz,M.S.** (1998c) *Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains*. Mol. Cell Biol., 18, 1601-1610.

**Lichtenstein,D.L., Toth,K., Doronin,K., Tollefson,A.E. and Wold,W.S.** (2004) *Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins*. Int. Rev. Immunol., 23, 75-111.

**Lowe,S.W., Schmitt,E.M., Smith,S.W., Osborne,B.A. and Jacks,T.** (1993) *p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes*. Nature, 362, 847-849.

**Lukashok,S.A., Tarassishin,L., Li,Y. and Horwitz,M.S.** (2000) *An adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis complexes with dynein and a small GTPase*. J. Virol., 74, 4705-4709.

**Luo,X., Budihardjo,I., Zou,H., Slaughter,C. and Wang,X.** (1998) *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 94, 481-490.

**MacEwan,D.J.** (2002) *TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences*. Cell Signal., 14, 477-492.

**Mahr,J.A. and Gooding,L.R.** (1999) *Immune evasion by adenoviruses*. Immunol. Rev., 168, 121-130.

**Marsh,M. and McMahon,H.T.** (1999) *The structural era of endocytosis*. Science, 285, 215-220.

**Martin,D.A., Siegel,R.M., Zheng,L. and Lenardo,M.J.** (1998) *Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal*. J. Biol. Chem., 273, 4345-4349.

**Martin,M., Del Valle,J.M., Saborit,I. and Engel,P.** (2005) *Identification of Grb2 as a novel binding partner of the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein binding receptor CD229*. J. Immunol., 174, 5977-5986.

- Martin,S.J., O'Brien,G.A., Nishioka,W.K., McGahon,A.J., Mahboubi,A., Saïdo,T.C. and Green,D.R.** (1995b) *Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis*. J. Biol. Chem., 270, 6425-6428.
- Martin,S.J., O'Brien,G.A., Nishioka,W.K., McGahon,A.J., Mahboubi,A., Saïdo,T.C. and Green,D.R.** (1995a) *Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis*. J. Biol. Chem., 270, 6425-6428.
- Martin,S.J., Reutelingsperger,C.P., McGahon,A.J., Rader,J.A., van Schie,R.C., LaFace,D.M. and Green,D.R.** (1995c) *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl*. J. Exp. Med., 182, 1545-1556.
- Martin-Blanco,E.** (2000) *p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions*. Bioessays, 22, 637-645.
- Mason,N.J., Artis,D. and Hunter,C.A.** (2004) *New lessons from old pathogens: what parasitic infections have taught us about the role of nuclear factor-kappaB in the regulation of immunity*. Immunol. Rev., 201, 48-56.
- Mautner,V. and Pereira,H.G.** (1971) *Crystallization of a second adenovirus protein (the fibre)*. Nature, 230, 456-457.
- McNiven,M.A.** (1998) *Dynamin: a molecular motor with pinchase action*. Cell, 94, 151-154.
- Micheau,O. and Tschopp,J.** (2003) *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 114, 181-190.
- Mitsunari,T., Nakatsu,F., Shioda,N., Love,P.E., Grinberg,A., Bonifacino,J.S. and Ohno,H.** (2005) *Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development*. Mol. Cell Biol., 25, 9318-9323.
- Moise,A.R., Grant,J.R., Vitalis,T.Z. and Jefferies,W.A.** (2002) *Adenovirus E3-6.7K maintains calcium homeostasis and prevents apoptosis and arachidonic acid release*. J. Virol., 76, 1578-1587.
- Morgan,R.A. and Anderson,W.F.** (1993) *Human gene therapy*. Annu. Rev. Biochem., 62, 191-217.
- Mousavi,S.A., Malerod,L., Berg,T. and Kjekshus,R.** (2004) *Clathrin-dependent endocytosis*. Biochem. J., 377, 1-16.
- Muzio,M., Chinnaiyan,A.M., Kischkel,F.C., O'Rourke,K., Shevchenko,A., Ni,J., Scaffidi,C., Bretz,J.D., Zhang,M., Gentz,R., Mann,M., Krammer,P.H., Peter,M.E. and Dixit,V.M.** (1996) *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-*

*3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. Cell, 85, 817-827.*

**Muzio,M., Stockwell,B.R., Stennicke,H.R., Salvesen,G.S. and Dixit,V.M.** (1998) *An induced proximity model for caspase-8 activation. J. Biol. Chem., 273, 2926-2930.*

**Naismith,J.H. and Sprang,S.R.** (1998) *Modularity in the TNF-receptor family. Trends Biochem. Sci., 23, 74-79.*

**Nakano,M.Y., Boucke,K., Suomalainen,M., Stidwill,R.P. and Greber,U.F.** (2000) *The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. J. Virol., 74, 7085-7095.*

**Naruse,I. and Keino,H.** (1995) *Apoptosis in the developing CNS. Prog. Neurobiol., 47, 135-155.*

**Natoli,G., Costanzo,A., Ianni,A., Templeton,D.J., Woodgett,J.R., Balsano,C. and Levvero,M.** (1997) *Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. Science, 275, 200-203.*

**Nauts H.C., Fowler G.H. and Bogato F.H.** (1953) *A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study. Acta Med. Scand. Suppl, 276, 1-103.*

**Naviaux,R.K., Costanzi,E., Haas,M. and Verma,I.M.** (1996) *The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. J. Virol., 70, 5701-5705.*

**Naviaux,R.K. and Verma,I.M.** (1992) *Retroviral vectors for persistent expression in vivo. Curr. Opin. Biotechnol., 3, 540-547.*

**Ndinya-Achola,J.O., Nsanze,H., Karasira,P., Fransen,L., D'Costa,L.J., Piot,P. and Ronald,A.R.** (1986) *Three day oral course of Augmentin to treat chancroid. Genitourin. Med., 62, 202-204.*

**Neumeyer,J., Hallas,C., Merkel,O., Winoto-Morbach,S., Jakob,M., Thon,L., Adam,D., Schneider-Brachert,W. and Schütze,S.** (2006) *TNF-receptor I defective in internalization allows for cell death through activation of neutral sphingomyelinase. Exp. Cell Res., 312, 2142-2153.*

**Nichols,B.J. and Lippincott-Schwartz,J.** (2001) *Endocytosis without clathrin coats. Trends Cell Biol., 11, 406-412.*

- Nossal,R.** (2001) *Energetics of clathrin basket assembly*. Traffic., 2, 138-147.
- Ohno,H., Stewart,J., Fournier,M.C., Bosshart,H., Rhee,I., Miyatake,S., Saito,T., Gallusser,A., Kirchhausen,T. and Bonifacino,J.S.** (1995) *Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins*. Science, 269, 1872-1875.
- Olusanya,O., Andrews,P.D., Swedlow,J.R. and Smythe,E.** (2001) *Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo*. Curr. Biol., 11, 896-900.
- Owen,D.J., Collins,B.M. and Evans,P.R.** (2004) *Adaptors for clathrin coats: structure and function*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 20, 153-191.
- Owen,D.J., Vallis,Y., Pearse,B.M., McMahon,H.T. and Evans,P.R.** (2000) *The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain*. EMBO J., 19, 4216-4227.
- Owen-Schaub,L.B., Zhang,W., Cusack,J.C., Angelo,L.S., Santee,S.M., Fujiwara,T., Roth,J.A., Deisseroth,A.B., Zhang,W.W., Kruzel,E. and .** (1995) *Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression*. Mol. Cell Biol., 15, 3032-3040.
- Paing,M.M., Temple,B.R. and Trejo,J.** (2004) *A tyrosine-based sorting signal regulates intracellular trafficking of protease-activated receptor-1: multiple regulatory mechanisms for agonist-induced G protein-coupled receptor internalization*. J. Biol. Chem., 279, 21938-21947.
- Pearse,B.M. and Bretscher,M.S.** (1981) *Membrane recycling by coated vesicles*. Annu. Rev. Biochem., 50, 85-101.
- Pegoraro,L., Palumbo,A., Erikson,J., Falda,M., Giovanazzo,B., Emanuel,B.S., Rovera,G., Nowell,P.C. and Croce,C.M.** (1984) *A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 81, 7166-7170.
- Pennica,D., Hayflick,J.S., Bringman,T.S., Palladino,M.A. and Goeddel,D.V.** (1985) *Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 82, 6060-6064.
- Pereira,H.G., Valentine,R.C. and Russell,W.C.** (1968) *Crystallization of an adenovirus protein (the hexon)*. Nature, 219, 946-947.
- Pike,L.J.** (2004) *Lipid rafts: heterogeneity on the high seas*. Biochem. J., 378, 281-292.

**Porter,A.G.** (1990) *Human tumour necrosis factors-alpha and -beta: differences in their structure, expression and biological properties*. FEMS Microbiol. Immunol., 2, 193-199.

**Ranheim,T.S., Shisler,J., Horton,T.M., Wold,L.J., Gooding,L.R. and Wold,W.S.** (1993) *Characterization of mutants within the gene for the adenovirus E3 14.7-kilodalton protein which prevents cytolysis by tumor necrosis factor*. J. Virol., 67, 2159-2167.

**Ringstad,N., Gad,H., Low,P., Di Paolo,G., Brodin,L., Shupliakov,O. and De Camilli,P.** (1999) *Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis*. Neuron, 24, 143-154.

**Robinson,M.S.** (1987) *100-kD coated vesicle proteins: molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies*. J. Cell Biol., 104, 887-895.

**Robinson,M.S. and Bonifacino,J.S.** (2001) *Adaptor-related proteins*. Curr. Opin. Cell Biol., 13, 444-453.

**Rodman,J.S., Levy,M.A., Diment,S. and Stahl,P.D.** (1990) *Immunolocalization of endosomal cathepsin D in rabbit alveolar macrophages*. J. Leukoc. Biol., 48, 116-122.

**Roelvink,P.W., Lizonova,A., Lee,J.G., Li,Y., Bergelson,J.M., Finberg,R.W., Brough,D.E., Kovesdi,I. and Wickham,T.J.** (1998) *The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F*. J. Virol., 72, 7909-7915.

**Rothberg,K.G., Heuser,J.E., Donzell,W.C., Ying,Y.S., Glenney,J.R. and Anderson,R.G.** (1992) *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*. Cell, 68, 673-682.

**Rothwarf,D.M., Zandi,E., Natoli,G. and Karin,M.** (1998) *IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I $\kappa$ B kinase complex*. Nature, 395, 297-300.

**Rowe,W.T., Heubner,R.J., Gallimore,L.K., Parrott,R.H. and Ward,T.G.** (1953) *Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84, 570-573.

**Rubinsztein,D.C., Barton,D.E., Davison,B.C. and Ferguson-Smith,M.A.** (1993) *Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches*



*and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number.* Hum. Mol. Genet., 2, 1713-1715.

**Rudel,T. and Bokoch,G.M.** (1997) *Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2.* Science, 276, 1571-1574.

**Salvesen,G.S. and Duckett,C.S.** (2002) *IAP proteins: blocking the road to death's door.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3, 401-410.

**Scaffidi,C., Schmitz,I., Zha,J., Korsmeyer,S.J., Krammer,P.H. and Peter,M.E.** (1999) *Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells.* J. Biol. Chem., 274, 22532-22538.

**Schaack,J.** (2005) *Induction and inhibition of innate inflammatory responses by adenovirus early region proteins.* Viral Immunol., 18, 79-88.

**Schmidt,A., Wolde,M., Thiele,C., Fest,W., Kratzin,H., Podtelejnikov,A.V., Witke,W., Huttner,W.B. and Soling,H.D.** (1999) *Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid.* Nature, 401, 133-141.

**Schneider-Brachert,W., Tchikov,V., Merkel,O., Jakob,M., Hallas,C., Kruse,M.L., Groitl,P., Lehn,A., Hildt,E., Held-Feindt,J., Dobner,T., Kabelitz,D., Krönke,M. and Schütze,S.** (2006) *Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism.* J. Clin. Invest.

**Schneider-Brachert,W., Tchikov,V., Neumeyer,J., Jakob,M., Winoto-Morbach,S., Held-Feindt,J., Heinrich,M., Merkel,O., Ehrenschwender,M., Adam,D., Mentlein,R., Kabelitz,D. and Schütze,S.** (2004) *Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles.* Immunity., 21, 415-428.

**Schroeder,R.J., Ahmed,S.N., Zhu,Y., London,E. and Brown,D.A.** (1998) *Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains.* J. Biol. Chem., 273, 1150-1157.

**Schurmann,A., Brauers,A., Massmann,S., Becker,W. and Joost,H.G.** (1995) *Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagBs, RagB1) with remote similarity to the Ras-related GTPases.* J. Biol. Chem., 270, 28982-28988.

**Schütze,S., Machleidt,T., Adam,D., Schwandner,R., Wiegmann,K., Kruse,M.L., Heinrich,M., Wickel,M. and Krönke,M.** (1999) *Inhibition of*

*receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling.* J. Biol. Chem., 274, 10203-10212.

**Schwartz,L.M., Smith,S.W., Jones,M.E. and Osborne,B.A.** (1993) *Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 90, 980-984.

**Shisler,J., Yang,C., Walter,B., Ware,C.F. and Gooding,L.R.** (1997) *The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis.* J. Virol., 71, 8299-8306.

**Shupliakov,O., Bloom,O., Gustafsson,J.S., Kjaerulff,O., Low,P., Tomilin,N., Pieribone,V.A., Greengard,P. and Brodin,L.** (2002) *Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 99, 14476-14481.

**Smale,G., Nichols,N.R., Brady,D.R., Finch,C.E. and Horton,W.E., Jr.** (1995) *Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease.* Exp. Neurol., 133, 225-230.

**Stan,R.V.** (2005) *Structure of caveolae.* Biochim. Biophys. Acta, 1746, 334-348.

**Stewart,P.L. and Burnett,R.M.** (1995) *Adenovirus structure by X-ray crystallography and electron microscopy.* Curr. Top. Microbiol. Immunol., 199 (Pt 1), 25-38.

**Stewart,P.L., Burnett,R.M., Cyrklaff,M. and Fuller,S.D.** (1991) *Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus.* Cell, 67, 145-154.

**Sundararajan,R., Cuconati,A., Nelson,D. and White,E.** (2001) *Tumor necrosis factor-alpha induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K.* J. Biol. Chem., 276, 45120-45127.

**Sundararajan,R. and White,E.** (2001) *E1B 19K blocks Bax oligomerization and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis.* J. Virol., 75, 7506-7516.

**Suomalainen,M., Nakano,M.Y., Keller,S., Boucke,K., Stidwill,R.P. and Greber,U.F.** (1999) *Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus.* J. Cell Biol., 144, 657-672.

**Susin,S.A., Zamzami,N., Castedo,M., Hirsch,T., Marchetti,P., Macho,A., Daugas,E., Geuskens,M. and Kroemer,G.** (1996) *Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease.* J. Exp. Med., 184, 1331-1341.

- Szewczyk,A. and Wojtczak,L.** (2002) *Mitochondria as a pharmacological target*. Pharmacol. Rev., 54, 101-127.
- Tang,P., Hung,M.-C. and Klostergaard,J.** (1996) *Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer*. Biochemistry, 35, 8216-8225.
- Tatton,N.A., Maclean-Fraser,A., Tatton,W.G., Perl,D.P. and Olanow,C.W.** (1998) *A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease*. Ann. Neurol., 44, S142-S148.
- Tchikov,V., Winoto-Morbach,S., Krönke,M., Kabelitz,D. and Schütze,S.** (2001) *Adhesion of immunomagnetic particles targeted to antigens and cytokine receptors on tumor cells determined by magnetophoresis*. J. Magnetism and Magnetic Materials, 225, 285-293.
- Tebar,F., Bohlander,S.K. and Sorkin,A.** (1999) *Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic*. Mol. Biol. Cell, 10, 2687-2702.
- ter Haar,E., Harrison,S.C. and Kirchhausen,T.** (2000) *Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 97, 1096-1100.
- Tollefson,A.E., Hermiston,T.W., Lichtenstein,D.L., Colle,C.F., Tripp,R.A., Dimitrov,T., Toth,K., Wells,C.E., Doherty,P.C. and Wold,W.S.** (1998) *Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells*. Nature, 392, 726-730.
- Tollefson,A.E., Scaria,A., Hermiston,T.W., Ryerse,J.S., Wold,L.J. and Wold,W.S.** (1996) *The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells*. J. Virol., 70, 2296-2306.
- Tollefson,A.E., Toth,K., Doronin,K., Kuppuswamy,M., Doronina,O.A., Lichtenstein,D.L., Hermiston,T.W., Smith,C.A. and Wold,W.S.** (2001) *Inhibition of TRAIL-induced apoptosis and forced internalization of TRAIL receptor 1 by adenovirus proteins*. J. Virol., 75, 8875-8887.
- Tortorella,D., Gewurz,B.E., Furman,M.H., Schust,D.J. and Ploegh,H.L.** (2000) *Viral subversion of the immune system*. Annu. Rev. Immunol., 18, 861-926.
- Tournier,C., Dong,C., Turner,T.K., Jones,S.N., Flavell,R.A. and Davis,R.J.** (2001) *MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines*. Genes Dev., 15, 1419-1426.

- Trotman,L.C., Mosberger,N., Fornerod,M., Stidwill,R.P. and Greber,U.F.** (2001) *Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1*. Nat. Cell Biol., 3, 1092-1100.
- Ungewickell,E. and Branton,D.** (1981) *Assembly units of clathrin coats*. Nature, 289, 420-422.
- Ungewickell,E., Ungewickell,H., Holstein,S.E., Lindner,R., Prasad,K., Barouch,W., Martin,B., Greene,L.E. and Eisenberg,E.** (1995) *Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles*. Nature, 378, 632-635.
- van der Goot,F.G. and Gruenberg,J.** (2002) *Oiling the wheels of the endocytic pathway*. Trends Cell Biol., 12, 296-299.
- van Oostrum,J. and Burnett,R.M.** (1985) *Molecular composition of the adenovirus type 2 virion*. J. Virol., 56, 439-448.
- Vanags,D.M., Porn-Ares,M.I., Coppola,S., Burgess,D.H. and Orrenius,S.** (1996) *Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis*. J. Biol. Chem., 271, 31075-31085.
- Vanden Berghe,W., Plaisance,S., Boone,E., De Bosscher,K., Schmitz,M.L., Fiers,W. and Haegeman,G.** (1998) *p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor*. J. Biol. Chem., 273, 3285-3290.
- Vaux,D.L., Weissman,I.L. and Kim,S.K.** (1992) *Prevention of programmed cell death in Caenorhabditis elegans by human bcl-2*. Science, 258, 1955-1957.
- Velier,J., Kim,M., Schwarz,C., Kim,T.W., Sapp,E., Chase,K., Aronin,N. and DiFiglia,M.** (1998) *Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways*. Exp. Neurol., 152, 34-40.
- Wajant,H., Pfizenmaier,K. and Scheurich,P.** (2003) *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death. Differ., 10, 45-65.
- Walters,R.W., Freimuth,P., Moninger,T.O., Ganske,I., Zabner,J. and Welsh,M.J.** (2002) *Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape*. Cell, 110, 789-799.
- Walters,R.W., Grunst,T., Bergelson,J.M., Finberg,R.W., Welsh,M.J. and Zabner,J.** (1999) *Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia*. J. Biol. Chem., 274, 10219-10226.
- Wanebo,H.J.** (1989) *Tumor necrosis factors*. Semin. Surg. Oncol., 5, 402-413.

- Weitzman,M.D.** (2005) *Functions of the adenovirus E4 proteins and their impact on viral vectors*. Front Biosci., 10, 1106-1117.
- Westphal,O.** (1975) *Bacterial endotoxins. The second Carl Prausnitz Memorial Lecture*. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 49, 1-43.
- Wickham,T.J., Filardo,E.J., Cheresch,D.A. and Nemerow,G.R.** (1994) *Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization*. J. Cell Biol., 127, 257-264.
- Wiegmann,K., Schütze,S., Machleidt,T., Witte,D. and Krönke,M.** (1994) *Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling*. Cell, 78, 1005-1015.
- Winzen,R., Kracht,M., Ritter,B., Wilhelm,A., Chen,C.Y., Shyu,A.B., Muller,M., Gaestel,M., Resch,K. and Holtmann,H.** (1999) *The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism*. EMBO J., 18, 4969-4980.
- Wold,W.S. and Gooding,L.R.** (1989) *Adenovirus region E3 proteins that prevent cytolysis by cytotoxic T cells and tumor necrosis factor*. Mol. Biol. Med., 6, 433-452.
- Wyllie,A.H. and Golstein,P.** (2001) *More than one way to go*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 98, 11-13.
- Yuasa,T., Ohno,S., Kehrl,J.H. and Kyriakis,J.M.** (1998) *Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38*. J. Biol. Chem., 273, 22681-22692.
- Yusuf,U., Hale,G.A., Carr,J., Gu,Z., Benaim,E., Woodard,P., Kasow,K.A., Horwitz,E.M., Leung,W., Srivastava,D.K., Handgretinger,R. and Hayden,R.T.** (2006) *Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients*. Transplantation, 81, 1398-1404.
- Zerial,M. and McBride,H.** (2001) *Rab proteins as membrane organizers*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2, 107-117.
- Zimmermann,K.C., Bonzon,C. and Green,D.R.** (2001) *The machinery of programmed cell death*. Pharmacol. Ther., 92, 57-70.

**Zou,H., Li,Y., Liu,X. and Wang,X.** (1999) *An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.* J. Biol. Chem., 274, 11549-11556.

## 8 Eigene Publikationen

Neumeyer,J., Hallas,C., **Merkel,O.**, Winoto-Morbach,S., Jakob,M., Thon,L., Adam,D., Schneider-Brachert,W. and Schütze,S. (2006) *TNF-receptor I defective in internalization allows for cell death through activation of neutral sphingomyelinase*. Exp. Cell Res., 312, 2142-2153.

Schneider-Brachert,W., Tchikov,V., **Merkel,O.**, Jakob,M., Hallas,C., Kruse,M.L., Groitl,P., Lehn,A., Hildt,E., Held-Feindt,J., Dobner,T., Kabelitz,D., Krönke,M. and Schütze,S. (2006) *Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism*. J. Clin. Invest.

Schneider-Brachert,W., Tchikov,V., Neumeyer,J., Jakob,M., Winoto-Morbach,S., Held-Feindt,J., Heinrich,M., **Merkel,O.**, Ehrenschwender,M., Adam,D., Mentlein,R., Kabelitz,D. and Schütze,S. (2004) *Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles*. Immunity., 21, 415-428.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Clathrin und AP-2.....	21
Abb. 2	Struktur von Adenoviruspartikeln.....	28
Abb. 3	Genom von Adenoviren.....	30
Abb. 4	Schematische Darstellung der eingesetzten TNF-R1-Konstrukte.....	51
Abb. 5	Zelloberflächenexpression der verschiedenen TNF-R1-Konstrukte.....	53
Abb. 6	Bestimmung der Internalisierung von TNF-R1-Konstrukten.....	55
Abb. 7	DISC-Rekrutierung an verschiedene TNF-R1-Konstrukte.....	59
Abb. 8	Morphologische Bestimmung der TNF-Zytotoxizität in verschiedenen TNF-R1-Zellen.....	61
Abb. 9	Konzentrationsabhängige Toxizität von TNF auf Zellen mit verschiedenen TNF-R1-Konstrukten.....	62
Abb. 10	Bestimmung der Expression und Internalisierung des TNF-R1 $\Delta$ TRID $\Delta$ NSD.....	65
Abb. 11	Bestimmung der TNF-Toxizität in TNF-R1 $\Delta$ TRID $\Delta$ NSD-Zellen.....	67
Abb. 12	Bestimmung der N-SMase-Aktivität nach TNF-Zugabe.....	69
Abb. 13	Expression von E3-14.7K in H1299-Zellen.....	73
Abb. 14	TNF-R1-Internalisierung in humanen E3-14.K-Zellen.....	74
Abb. 15	DISC-Rekrutierung in humanen E3-14.K-Zellen.....	75
Abb. 16	TNF-Resistenz humaner E3-14.7K-Zellen.....	77
Abb. 17	Expression von E3-14.7K in Ad5-infizierten H1299-Zellen.....	79
Abb. 18	Infektion von H1299-Zellen mit Ad5.....	81
Abb. 19	TNF-R1-Internalisierung in Ad5-infizierten H1299-Zellen.....	82
Abb. 20	DISC-Rekrutierung in Ad5-infizierten H1299-Zellen.....	84



Abb. 21	E3-14.7K-vermittelte TNF-Resistenz in Ad5-infizierten H1299-Zellen	86
.....		
Abb. 22	Modell der TNF-R1-Signaltransduktion	98
.....		

## 10 Abkürzungsverzeichnis

AAK1	<i>adaptor-associated kinase-1</i>
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
ADP	Adenosindiphosphat
ADP	<i>adenovirus death protein</i>
AFT2	<i>activating transcription factor 2</i>
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
ANT	<i>adenine nucleotide translocator</i>
AP	<i>adaptor protein</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
A-SMase	<i>acid sphingomyelinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bad	<i>Bcl2-antagonist of cell death</i>
bax	<i>Bcl2-associated x protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BH	<i>Bcl-2 homology</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
bidest.	bidestilliert
bp	<i>basepair</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>
CAR	<i>coxsackie and adenovirus receptor</i>
Caspase	<i>cystein-aspartat-specific protease</i>
CHC	<i>clathrin heavy chain</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ced-9	<i>cell death abnormal-9</i>
CHX	Cycloheximid
c-Jun	<i>NH2-terminal kinase</i>
CREB	<i>cAMP-response element-binding protein</i>
DD	<i>death domain, Todesdomäne</i>
DED	<i>death effector domain</i>

DIABLO	<i>direct IAP-binding protein with low PI</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleotide acid</i>
DR	<i>death receptor</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDAR	<i>ectodysplasin receptor</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor-receptor</i>
E	<i>early</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas associated death domain protein</i>
FAN	<i>factor associated with N-SMase</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FIP	<i>14.7K interacting protein</i>
FKS	fötales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
gp	glykolisiertes Protein
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2.</i>
HEK	<i>human embryonal kidney</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsc	<i>heat shock protein</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
iCAD	<i>inhibitor of CAD</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I- $\kappa$ B	<i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
IKK	<i>I-<math>\kappa</math>B kinase</i>

IL	Interleukin
ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
J-Protein	<i>J-domain containing protein</i>
konz.	konzentriert
L	<i>late</i>
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MVB	<i>multivesicular body</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NEMO	<i>NF-<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSD	<i>neutral sphingomyelinase domain</i>
N-SMase	<i>neutral sphingomyelinase</i>
Nup	Nucleoporin
PAC2	<i>p21-activated kinase-2</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLAD	<i>preligand assembly domain</i>
PTP	<i>permeability transition pore</i>
Rab	<i>ras associated in brain</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RID	<i>receptor internalization and degradation</i>
RIP-1	<i>receptor interacting protein-1</i>
RNA	<i>ribonucleotide acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S.	Seite
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>

SODD	<i>silencer of death domain</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
Tab.	Tabelle
TACE	<i>TNF alpha converting enzyme</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBSBG	TBS-Glycin-BSA
TBST	TBS-Tween
tBid	<i>truncated Bid</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGN	<i>trans-Golgi Netzwerk</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R1	TNF-Rezeptor 1
TNF-R2	TNF-Rezeptor 2
TRADD	<i>TNF-receptor associated death domain protein</i>
TRAF-2	<i>TNF receptor associated factor-2</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRAILR	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand-receptor</i>
TRAMP	<i>TNF receptor-associated apoptosis-mediating protein</i>
TRID	<i>TNF-R1 internalization domain</i>
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....  
Oliver Merkel

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen sehr herzlich bedanken, ohne deren Hilfe die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

PD Dr. Wulf Schneider danke ich für die Zurverfügungstellung eines hochinteressanten Themas und für die Bereitschaft zur Betreuung meiner Arbeit. Seine Kreativität und sein Optimismus waren stets Ansporn. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die vielen interessanten (auch nicht wissenschaftlichen) Gespräche bedanken, die u.a. meinen ersten Aufenthalt in Kiel sehr angenehm gestalteten.

Prof. Dr. Stephan Schneuwly danke ich für die bereitwillige Vertretung der Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

Prof. Dr. Norbert Lehn danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und dafür, dass er meine Anmeldung als Doktorand ermöglichte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Maria Kurz, Dr. Gertrud Knoll, Regine Birngruber, Ines Tschertner, Stefanie Denk, Christine Irtenkauf, Dr. Katharina Kranzer, Dr. Michael Aigner, Sascha Barabas, Martin Ehrenschwender, Dr. Alexander Eckhardt, Johannes Röhl und Christian Schütz für die stets angenehme Laboratmosphäre und für die Hilfe bei der Lösung vieler praktischer Probleme. Maria Kurz danke ich darüber hinaus für den einen oder anderen kostenlosen Besuch des Stadt-Theaters.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dietrich Kabelitz, Prof. Dr. Stefan Schütze, Dr. Jens Neumeyer, Dr. Marten Jakob, Dr. Cora Hallas, Dr. Vladimir Tschikov, Dr. Supandi Winito-Morbach und Andrea Hethke für die gastfreundliche Aufnahme während meiner Aufenthalte in Kiel und die konstruktive Zusammenarbeit, ohne die die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Prof. Dr. Thomas Dobner und Peter Groitl danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Experimenten mit Adenoviren.

Prof. Dr. Daniela Männel, Prof. Dr. Thomas Hehlhans und Dr. Christoph Scherübl danke ich für die Bereitstellung der TNF-R1/2-defizienten Zellen samt Kulturmedium und für die Hilfe bei den Mikroskoppräparaten.

Dr. Dietmar Gross danke ich für den Zugang zu einem konfokalen Lasermikroskop und für die viele Zeit und Mühen, die er in die Entstehung der Bilder investiert hat. Besonders möchte ich mich bei ihm für die Vorstellung von Ines Heinrich bedanken.

Zudem möchte ich allen anderen nicht genannten Personen danken, die in der einen oder anderen Form zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt den Teilnehmern des Klinikum-Lauftreffs, die einen entspannenden Ausgleich zum Laboralltag schafften: Thomas und Sabine Langmann, Christoph Möhle, Peter Walbrun, Monika Lichtinger, Sabine Heimerl, Gerhard Liebisch, Achim und Vicky Ehrnsperger und Sven Schimanski.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich stets unterstützt haben.

Der größte Dank gilt meiner Freundin Ines Heinrich, die mich durch die letzten Höhen und Tiefen meiner Arbeit begleitete und mir immer Rückhalt und Stütze war.